

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS



Ciências
ULisboa

**BIOLOGIA, FILOGEOGRAFIA E HISTÓRIA DEMOGRÁFICA DO SARGO-DO-
SENEGAL, *Diplodus bellottii* (Steindachner, 1882) NO SUL DO NORDESTE
ATLÂNTICO**

Doutoramento em Biologia,
Especialidade Biologia Marinha e Aquacultura

Catarina Vieira Lisboa Vendrell Henriques

Tese orientada por:
Prof. Doutor Leonel Serrano Gordo
Profª Doutora Joana Robalo

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de Doutor

2018

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS



**Ciências
ULisboa**

**BIOLOGIA, FILOGEOGRAFIA E HISTÓRIA DEMOGRÁFICA DO SARGO-DO-SENEGAL,
Diplodus bellottii (Steindachner, 1882) NO SUL DO NORDESTE ATLÂNTICO**

Doutoramento em Biologia,
Especialidade Biologia Marinha e Aquacultura

Catarina Vieira Lisboa Vendrell Henriques

Tese orientada por:
Prof. Doutor Leonel Serrano Gordo

Profª Doutora Joana Robalo

Júri:

Presidente:

- Doutor Henrique Manuel Roque Nogueira Cabral, Professor Catedrático da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Vogais:

- Doutor Jorge Manuel dos Santos Gonçalves, Investigador Auxiliar Centro de Ciências do Mar (CCMAR) da Universidade do Algarve.
- Doutora Joana Isabel do Espírito Santo Robalo, Professora Auxiliar ISPA-Inst.Universitário de Ciências Psicológicas, Sociais e da Vida.
- Doutora Sara Isabel da Silva Martins Francisco, Investigadora ISPA-Inst.Universitário de Ciências Psicológicas, Sociais e da Vida.
- Doutora Maria José Rosado Costa, Professora Catedrática Aposentada, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Doutor Henrique Manuel Roque Nogueira Cabral, Professor Catedrático da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

ÍNDICE DE CONTEÚDOS

Agradecimentos.....	1
Abstract and Keywords	5
Resumo e Palavras-chave.....	6
Lista de Tabelas.....	7
Lista de Figuras	8
Lista de Apêndices	11
CAPÍTULO 1	12
INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 Família <i>Sparidae</i> : características taxonômicas gerais, sua distribuição e ecologia	12
1.2 Visão geral das pescas do género <i>Diplodus spp</i>	14
1.3 <i>Diplodus bellottii</i> : conhecimento da espécie e sua atual distribuição e ecologia.....	16
1.4 Objetivos da tese	18
1.5. Plano da tese.....	19
PARTE 1	21
BIOLOGIA	22
CAPÍTULO 2	23
IDADE E CRESCIMENTO.....	23
2.1 Introdução	23
2.2 Material e métodos	25
2.3 Resultados	27
2.4 Discussão.....	35
CAPÍTULO 3	38
REPRODUÇÃO.....	38
3.1 Introdução	38
3.2 Material e métodos	40
3.3 Resultados	43
3.4 Discussão.....	53
PARTE 2	57
ESTRUTURA DE STOCKS.....	58
CAPÍTULO 4	59
PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS.....	59
4.1 Introdução	59
4.2 Material e métodos	61
4.3 Resultados	66

4.4 Discussão.....	73
CAPÍTULO 5	77
PADRÃO FILOGEOGRÁFICO DO SARGO-DO-SENEGAL, <i>Diplodus bellottii</i>	77
5.1 Introdução	77
5.2 Material e métodos	83
5.3 Resultados	86
5.4 Discussão.....	94
CAPÍTULO 6	98
CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
REFERÊNCIAS	104
APÊNDICES.....	126
APÊNDICES I e II.....	127

Agradecimentos

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Doutoramento em Biologia, especialidade Biologia Marinha e Aquacultura, me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras que, embora poucas, retratam um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

Ao Coordenador do Doutoramento em Biologia, especialidade Biologia Marinha e Aquacultura, Professor Doutor Henrique Manuel Roque Nogueira Cabral, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este Doutoramento que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

Ao Professor Doutor Leonel Serrano Gordo, por me ter incentivado e apoiado, desde o primeiro momento, na minha vontade de enveredar pela continuação da minha formação académica e científica, regressando a esta Instituição, expresso o meu profundo agradecimento. Agradecimento pela orientação deste projeto e apoio incondicionais, que muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer sempre saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor. Agradeço também a oportunidade que me deu de integrar o seu grupo de investigação e reconheço, com gratidão, não só a confiança que em mim depositou, desde o início, mas também, o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases do projeto. Agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, nos momentos de maior aflição.

À Professora Doutora Joana Robalo, o meu sincero agradecimento pela coorientação neste projeto. Muito obrigada pelo profissionalismo, pela sincera amizade e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo. O seu apoio foi determinante na elaboração desta Tese. Ao Instituto Universitário de Ciências Psicológicas, Sociais e da Vida (ISPA) e ao Grupo de Investigação em Eco-Etologia, por possibilitar o uso dos laboratórios de genética e respetivo equipamento, e em especial ao Professor Doutor Vitor Almada, que foi o responsável impulsor deste projeto, que me acolheu no então Centro de Biociências do ISPA, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha Tese e por permitir a minha integração num centro de investigação

de tão elevada qualidade e exigência. Agradeço também a sua simpatia e enorme disponibilidade, sempre atento, sempre preocupado, sempre afável. Para ele um cumprimento muito sentido.

Ao Centro de Investigação MARE, Centro de Ciências do Mar e do Ambiente, que me integrou neste projeto e me proporcionou a participação em reuniões, colóquios e *workshops*.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) que subsidiou este doutoramento através de uma bolsa (Referência SFRH / BD / 65078 / 2009), e possibilitou a execução desta tese e algumas das deslocações que tive de realizar durante o período de recolha de amostras.

Ao IPMA agradeço a disponibilidade na obtenção de algumas amostras, sempre prontificando-se em prol da ciência e da amizade que fui construindo ao longo de mais de 1 década. Quero ainda deixar expresso um agradecimento especial aos meus colegas do IPMA, que há anos me acompanham e aos quais eu devo muitos ensinamentos: à Fátima, à Lurdes, à Francisca, Francisco, Pedro, Albuquerque, à Isabel, à Ana Maria, à Emília, ao Yorgos, e ainda um agradecimento muito, mas mesmo muito especial a um colega e amigo, o Alberto, que sempre me apoiou incondicionalmente, sempre com grande disponibilidade, aconselhando, motivando e prestando todo e qualquer auxílio que eu necessitasse. Estarás sempre presente nos meus dias e sempre na minha memória, como um cientista íntegro, trabalhador, sempre com boa-disposição e sorriso nos lábios.

O meu agradecimento também aos Mestres Luís Cesario, e ao Sr. José Guerreiro, pela disponibilidade e simpatia, que dedicadamente proviram as amostras frescas de Sargodo-Senegal, capturados quer em Alcochete, Montijo e ainda ao Mestre Pedro “Matuta”, e a toda a equipa da chata Vitorino Velho de arte xávega da Costa da Caparica, que muitas vezes disponibilizaram amostras da espécie alvo, e sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço também às colegas do Laboratório de Biologia Pesqueira, Ana, Vera, Ana Rita e Rafaela, toda a amabilidade e paciência, companheirismo, amizade e boa disposição em todos os momentos, que ao longo destes últimos anos sempre me apoiaram, e cuja experiência foi sempre fonte motivadora. A vossa ajuda e sabedoria foi essencial para que chegasse ao fim deste trabalho com um enorme sentimento de satisfação. Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular no ISPA, à Sara, ao Fred, à Carla, Cristina, Pedro e

Clara, pela sempre pronta disponibilidade e colaboração, ao longo das análises de genética molecular realizadas, e também no processo de revisão da tese.

A todos os meus amigos, em especial ao Mário, Repas e à Sofia, Milva, Fátima, Lurdes, e mais recentemente à Marta e Luisa, pelos desabafos ouvidos, pelo apoio prestado em todos os momentos e por não me deixarem nunca desistir dos meus objetivos, das minhas convicções, e mais ainda, das ambições. Muito Obrigada!

À minha família, em particular aos meus pais, sempre fonte de inspiração na procura de ir mais além, em busca do sucesso profissional. A eles devo o apoio sempre prestado, carinho e amor incondicional, pois sempre acreditaram nesta minha paixão por Biologia Marinha, desde o primeiro momento em que enveredei por este caminho e sempre me acompanharam até aqui, atentos a todos os passos, nos desânimos momentâneos e no alcance das pequenas vitórias. Grata por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida que me vêm proporcionando. A eles dedico este trabalho de mais de quatro anos, foi por eles muitas vezes que a motivação esteve sempre presente. Aos meus filhos, David, Mariana, Catarina, Ricardo e Diogo, que sempre estiveram presentes, em todos os dias, presenciando a minha falta de tempo, ou mesmo de paciência, períodos de irritabilidade com os quais tiveram de viver, e mais aqueles tempos que não vos pude dedicar em exclusivo, obrigada pela compreensão, paciência, carinho. Este projeto é também vosso, exemplo de que pela determinação e trabalho tudo se alcança. Quem sabe agora poderei ter mais tempo... Ao Luís, agradeço a partilha de bons momentos, a ajuda e os estímulos nas alturas de desânimo, a dureza e determinação nos momentos de fraqueza. Pela amizade, companhia e afeto, pela transmissão de confiança, o meu agradecimento.

Por tudo, a minha enorme gratidão! Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A vocês dedico todo este trabalho.

Esta tese foi financiada com uma Bolsa de Doutorado da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Referência SFRH / BD / 65078 / 2009).

This thesis was funded by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), through the PhD grant awarded to the author (SFRH/BD/ 65078 / 2009).



Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Abstract and Keywords

The biology and ecology of many commercially less important species are not subject to study as they are not being explored. Knowledge of the structure of stocks and degree of mixing among populations is vital for understanding the ecological diversity of marine resources. Senegal seabream, *Diplodus bellottii*, is a shallow-water coastal species, and its exploitation is not regulated. The interest in its study, besides intensifying the knowledge of the species, is related to the increasingly northward movement of its geographical distribution, in the south of the Northeast Atlantic.

Biological and ecological information is almost non-existent and the few that exist are somewhat contradictory. As far as the stock structure is concerned, it is unknown. This thesis aims to compile biological information and to clarify, as much as possible, its stock structure in the extension of its geographic distribution. The study of age and growth confirms that it is a moderate growing, long-lived and vulnerable to fishing by-catch. Reproduction studies reveal new information regarding the reproductive strategy, being a dioecious species whose type of fecundity has been investigated and appears to be of indeterminate type, although further study is needed. The evolution of maturity stages throughout the year, bioenergetic indices and length at the 1st maturation were analyzed in order to characterize the Senegal seabream sexual cycle in Portuguese waters. The stock structure was investigated following a holistic approach involving complementary techniques. Parameters of life history, geometric morphometry of body and otolith shape and molecular analysis were analyzed and the results clearly suggest the existence of only one stock of Senegal seabream along the south part of northeast Atlantic and Portuguese waters.

Keywords: Senegal bream; age and growth; reproduction; stock structure.

Resumo e Palavras-chave

A biologia e ecologia de muitas espécies comercialmente menos importantes não são sujeitas a estudo, já que as mesmas não se encontram a ser exploradas. O conhecimento da estrutura de stocks e grau de mistura entre populações é vital para o conhecimento da diversidade ecológica dos recursos marinhos. O Sargo-do-Senegal, *Diplodus bellottii*, é uma espécie costeira, de águas pouco profundas, e a sua exploração não é regulamentada. O interesse no seu estudo, para além de intensificar o conhecimento da espécie, prende-se com a deslocação cada vez mais para norte da sua distribuição geográfica, no sul do Nordeste Atlântico. Informação biológica e ecológica é quase inexistente e a pouca que existe é de algum modo contraditória. No que respeita à estrutura de stock, essa então é desconhecida. Esta tese tem como objetivo compilar informação biológica e clarificar, tanto quanto possível, a sua estrutura de stocks na extensão da distribuição geográfica da espécie. O estudo da idade e crescimento confirma que se trata duma espécie de crescimento moderado, de vida longa, que se encontra vulnerável à exploração piscatória “by-catch”. Os estudos sobre a reprodução revelam informação nova relativamente à estratégia reprodutiva, sendo uma espécie dióica, cujo tipo de fecundidade foi investigado e aparenta ser do tipo indeterminado, embora necessite de estudo mais aprofundado. A evolução dos estádios de maturação ao longo do ano, os índices bioenergéticos e o comprimento à 1ª maturação foram analisados por forma a caracterizar o ciclo sexual do Sargo-do-Senegal em águas portuguesas. A estrutura de stocks foi investigada seguindo uma abordagem holística que envolveu técnicas complementares. Parâmetros da história de vida, morfometria geométrica do corpo e forma do otólito e análise molecular foram analisados e os resultados claramente sugerem a existência de apenas um único stock do Sargo-do-Senegal ao longo do sul nordeste Atlântico e em águas Portuguesas.

Palavras-chave: Sargo-do Senegal; idade e crescimento; reprodução; estrutura do stock.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Índices de precisão da leitura de idades em otólitos de <i>Diplodus bellottii</i> da região centro de Portugal	30
Tabela 2. Chave Comprimento-Idade para fêmeas de Sargo-do-Senegal, <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro de Portugal, para o período 2011-2015	32
Tabela 3. Chave Comprimento-Idade para machos de Sargo-do-Senegal, <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro de Portugal, para o período 2011-2015	33
Tabela 4. Resumo dos parâmetros de von Bertalanffy estimados para o Sargo-do-Senegal, <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro de Portugal	34
Tabela 5. Distâncias Procrustes entre forma média do corpo de <i>Diplodus bellottii</i> das 3 áreas em estudo e os correspondentes valores de p	67
Tabela 6. Matriz classificação cruzada da análise discriminante realizada em <i>D. bellottii</i> das 3 áreas de estudo no NE Atlântico	70
Tabela 7. Sumário da MANOVA (n=228) aplicada aos NEFDs dos otólitos das 3 áreas geográficas em estudo: Algarve, Cádiz e Sado	72
Tabela 8. Matriz de classificação da análise discriminante entre as 3 áreas	72
Tabela 9. Número, haplótipos, medidas de diversidade para as sequências de CR de <i>D. bellottii</i> , para os grupos populacionais dos diferentes locais de amostragem neste estudo	87
Tabela 10. Número, haplótipos, medidas de diversidade para as sequências de S7 de <i>D. bellottii</i> , para os grupos populacionais dos diferentes locais de amostragem neste estudo.....	87
Tabela 11. Fluxo génico entre locais amostrados de <i>Diplodus bellottii</i>	89
Tabela 12. Distâncias médias corrigidas entre populações	90
Tabela 13. Parâmetros demográficos de <i>Diplodus bellottii</i> baseado no CR e S7.....	92

Lista de Figuras

Figura 1. Árvore filogenética da família Sparidae.....	12
Figura 2. Capturas nominais de <i>Diplodus</i> spp., em toneladas, entre 1980 e 2016	15
Figura 3. Evolução do preço médio €/kg peixe das capturas anuais de <i>Diplodus</i> spp., entre 1982 e 2016	15
Figura 4. Delta do Rio Sine-Saloum, no Senegal, mapa e foto	17
Figura 5. Distribuição do Sargo-do-Senegal (Fishbase)	18
Figura 6. Distribuição de frequência de comprimentos, segundo o sexo, de <i>D.bellottii</i> na região centro de Portugal	27
Figura 7. Relação Comprimento – Peso para fêmeas de <i>D.bellottii</i> , na região centro de Portugal	28
Figura 8. Relação Comprimento-Peso para machos de <i>D.bellottii</i> , na região centro de Portugal	29
Figura 9. Otólito <i>sagitta</i> de <i>Diplodus bellottii</i> da região centro de Portugal	30
Figura 10. Padrão de variação mensal da percentagem de margem opaca (escuro) e translúcida (branca) nos otólitos de <i>Diplodus bellottii</i>	31
Figura 11. Evolução mensal da taxa de incremento marginal em <i>D.bellottii</i>	31
Figura 12. Modelo de crescimento de von Bertalanffy para fêmeas ($n=369$) de Sargo-do-Senegal, <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro de Portugal	34
Figura 13. Modelo de crescimento de von Bertalanffy para machos ($n=296$) de Sargo-do-Senegal, <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro de Portugal	35
Figura 14. Distribuição sazonal dos estádios maturação de fêmeas de <i>Diplodus</i> <i>bellottii</i> , na região centro de Portugal	44
Figura 15. Distribuição sazonal dos estádios maturação de machos de <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro de Portugal	44
Figura 16. Secção histológica de ovário de fêmea de Sargo-do-Senegal, em desova	45
Figura 17. Representação gráfica do Índice Gonadosomático (IGS) médio, por mês, \pm desvio-padrão, dos machos e fêmeas em <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro de Portugal Continental	46
Figura 18. Representação gráfica do Índice Hepatosomático (IHS) médio, por mês, \pm desvio-padrão, dos machos e fêmeas em <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro	

de Portugal Continental	47
Figura 19. Representação gráfica do Factor de Condição (K) médio, por mês, ±desvio-padrão, dos machos e fêmeas em <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro de Portugal Continental	48
Figura 20. Representação gráfica da maturação de machos e fêmeas de <i>Diplodus bellottii</i> , na região centro de Portugal	50
Figura 21. Distribuição de frequências do tamanho oocitário de <i>D. bellottii</i> (% de abundância por classes diâmetro 50 µm) durante o período de desova	51
Figura 22. Número de alvéolos corticais e de oócitos vitelogénicos de Sargo-do Senegal, por grama de fêmea eviscerada, ±desvio-padrão, durante a época de desova	52
Figura 23. Diâmetro médio dos oócitos vitelogénicos avançados, valor médio por mês ±desvio-padrão, de <i>Diplodus bellottii</i> ao longo da época de postura	52
Figura 24. Mapa da localização das áreas amostradas	62
Figura 25. <i>Landmarks</i> usadas na análise morfometria geométrica dos indivíduos de <i>D. bellottii</i>	63
Figura 26. Análise Procrustes, correção alométrica	67
Figura 27. Forma média de Sargo-do-Senegal das 3 diferentes áreas.	68
Figura 28. Alometria ontogenética para <i>Diplodus bellottii</i> , análise de variâncias canónicas (CVA) da variação da forma entre os Sargos-do-Senegal provenientes de 3 diferentes áreas de distribuição.	69
Figura 29. Média e desvio-padrão da variância cumulativa de 100 harmónicos para 10 otólitos selecionados ao acaso	71
Figura 30. Análise discriminante dos indivíduos de <i>D. bellottii</i> , baseado em 17 descritores normalizados elípticos de Fourier, provenientes de 3 diferentes áreas de distribuição	73
Figura 31. Mapa com as atuais principais correntes oceânicas mundiais: correntes oceânicas de superfície e sub-superfície	79
Figura 32. Rede de haplótipos para o CR de <i>D. bellottii</i>	88
Figura 33. Rede de haplótipos para o S7 de <i>D. bellottii</i>	88
Figura 34. Bayesian Skyline Plot, BSP, em escala Logarítmica, para o CR de <i>Diplodus bellottii</i>	93

Figura 35. Bayesian Skyline Plot, BSP, em escala Logarítmica, para o S7 de	
<i>Diplodus bellottii</i>	94

Lista de Apêndices

Apêndice I. Estádios macroscópicos e microscópicos de maturação para fêmeas (baseado em Brown-Petersen et al, 2011)	132
Apêndice II. Estádios macroscópicos e microscópicos de maturação para machos (baseado em Brown-Petersen et al, 2011)	133

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Família Sparidae: características taxonómicas gerais, sua distribuição e ecologia

Sparidae é uma família de peixes da Classe Actinopterygii, Ordem Perciformes, Subordem Percoidei que compreende um total de 100 espécies, em 29 géneros, entre os quais o género *Diplodus*. Deste total de espécies, 24 (pertencentes a 10 géneros) encontram-se descritas para a costa do Atlântico Nordeste e do Mediterrâneo (Bauchot e Hureau, 1986). A família Sparidae foi tradicionalmente dividida em 3 subfamílias: Denticinae, Sparinae e Boopsinae (Tortonese, 1975; Fiedler, 1991), com base na sua dentição e dieta alimentar (Summerer et al., 2001). Efetivamente, as características adaptativas relacionadas com a alimentação mostraram ter uma grande plasticidade (Meyer, 1993; Stiassny, 1996) relativamente a outras características morfológicas (Chow e Kishino, 1995; Birstein e DeSalle, 1998; Nelson, 2006).

De la Herrán et al. (2001) descrevem uma visão completa das relações taxonómicas e filogenéticas da família Sparidae (Figura 1).

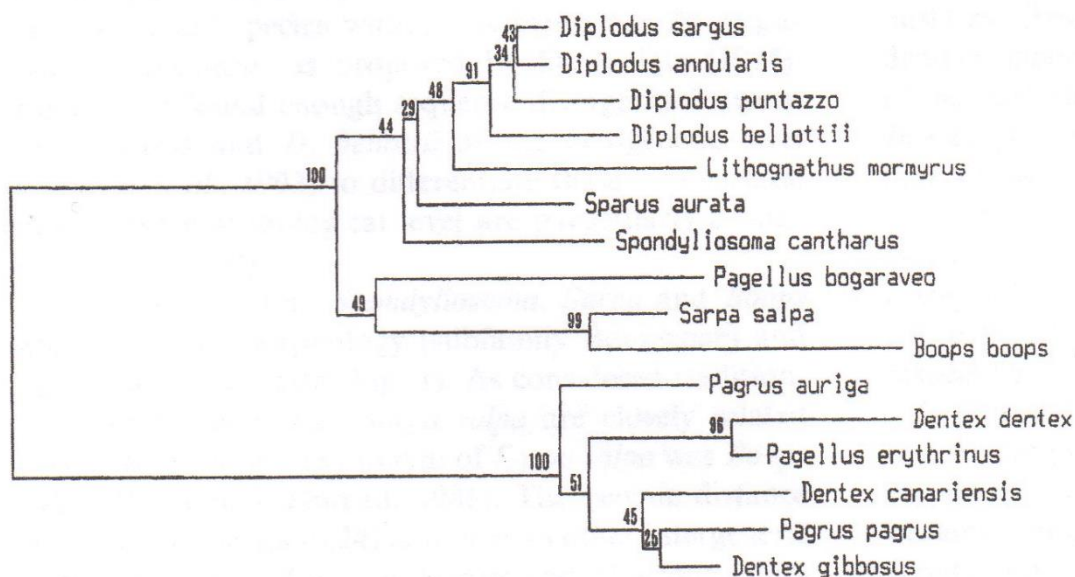


Figura 1. Árvore filogenética da família Sparidae. Adaptado de De La Herrán et al., 2001 (números são índices de Bootstrap do ADN do satélite ECORI).

A análise filogenética realizada por estes autores sugere a divisão em duas grandes linhagens, a primeira composta pelas espécies dos géneros *Sparus*, *Diplodus*, *Lithognathus*, *Spondyllosoma*, *Boops*, *Sarpa* e ainda a espécie *Pagellus bogaraveo* Brünnich, 1768; a segunda que engloba as restantes espécies dos géneros *Pagrus*, *Dentex* e *Pagellus erythrinus* Linnaeus, 1758.

Os Sparídeos encontram-se entre os peixes comercialmente importantes e com elevado valor para os consumidores, considerando não apenas a pesca em pequena escala e a pesca semi-industrial, mas também, e cada vez de uma forma mais evidente, a aquacultura, que se desenvolve por todo o Mediterrâneo (Hanel e Sturmbauer, 2000; Bargelloni et al., 2005). A título de exemplo, a safia (*D. vulgaris* Geoffroy Saint-Hilaire, 1817), o pargo (*Pagrus pagrus* Linnaeus, 1758), a dourada (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758), a choupa (*Spondyllosoma cantharus* Linnaeus, 1758), a bica (*Pagellus erythrinus* Linnaeus, 1758) e o besugo (*Pagellus acarne* Risso, 1827), constituem em Portugal, e particularmente na sua costa Sul e Sudoeste, um dos grupos de recursos pesqueiros mais relevantes em termos de capturas e valor comercial (Gonçalves, 2000). Neste contexto, as espécies do género *Diplodus* têm também sido um recurso de grande interesse ao longo dos anos, dado o seu elevado valor comercial.

Na região Atlântica, as espécies do género *Diplodus* mais comuns são: *Diplodus vulgaris* Geoffroy Saint-Hilaire, 1817, *Diplodus sargus* Forsskål, 1775, *Diplodus annularis* Linnaeus, 1758, *Diplodus puntazzo* Walbaum, 1792, *Diplodus cervinus* Lowe, 1838 e *Diplodus bellottii* Steindachner, 1882. Estas espécies são consideradas bentopelágicas e demersais (Bauchot e Hureau, 1986; Froese e Pauly, 2018). Habitam a zona litoral costeira da plataforma continental, normalmente águas costeiras temperadas e tropicais, pouco profundas, com preferência por zonas de areia ou leitos de algas marinhas e em fundos de algas rochosos, entre os 0-150 metros de profundidade. Mas há algumas adaptações de espécie para espécie: por exemplo, *D. annularis* prefere fundos arenosos pouco profundos nunca excedendo os 50m de profundidade (Alós e Palmer, 2009). A maiores profundidades, para além dos 40m, esta espécie é substituída por *D. cervinus*, *D. vulgaris*, *D. puntazzo*, *D. sargus* (Pajuelo e Lorenzo, 2001), sendo que *D. cervinus* ocorre aos 80m, podendo atingir um máximo de 300 m de profundidade (Pajuelo et al., 2003a,b). *D. puntazzo* e *D. vulgaris* estão descritos como preferindo costas rochosas até um máximo de 150m a 160m de profundidades, respetivamente (Dominguez-Seoane et al., 2006; Pajuelo et al., 2008; Gonçalves et al., 2003). São, pois, espécies que dominam

os agrupamentos de peixes em zonas rochosas, pouco profundas, dos habitats infra-litorais (Sala e Ballesteros, 1997), sendo muito abundantes em regiões costeiras, particularmente no Mediterrâneo. Estão descritas como espécies de movimentos rápidos, que possuem uma alta taxa metabólica, geralmente não atingindo grandes tamanhos.

1.2 Visão geral das pescas do género *Diplodus* spp.

O território Continental, situando-se numa zona de transição para ecossistemas mais quentes, apresenta uma elevada diversidade de espécies de pescado, mas uma baixa abundância de capturas por espécie (DGPA, 2016). São os fatores determinantes que caracterizam a costa ocidental, como a existência de fenómenos sazonais e afloramentos costeiros (“Upwelling”), e a costa algarvia, sob a influência das águas do Mediterrâneo, que propensiam a diversidade de espécies e a abundância de pequenos pelágicos (DGPA, 2016). As subáreas da ZEE dos Açores e da Madeira, embora possuam elevadas dimensões, apresentam reduzidas áreas de pesca, com muito reduzidas plataformas continentais, às quais se seguem profundidades elevadas, para além de algumas fragilidades a nível biológico, características naturais que se traduzem numa menor riqueza piscícola relativamente às restantes zonas de pesca comunitárias. A abundância é assim determinada pela batimetria, condições hidrológicas e natureza dos fundos, especialmente no que se refere às espécies demersais.

As espécies do género *Diplodus* são recursos altamente valiosos em Portugal embora nem todas tenham igual valor comercial (INE/DGRM, 2009). A título de exemplo, em 2016 eram o 14º recurso mais importante desembarcado e o 12º em termos do valor comercializado (INE/DGRM, 2017). Os dados oficiais e de gestão não consideram estas espécies individualmente, mas sim o género *Diplodus* como um todo, pela possibilidade de ocorrência de irregularidades na identificação das várias espécies, o que é uma limitação à realização de estudos científicos e gestão apropriada do recurso.

Analisando as capturas nominais de *Diplodus* spp. ao longo do tempo, publicadas pelo INE/DGRM para o continente, no período entre 1980-2016, pode afirmar-se que a pesca experimentou uma tendência crescente do início dos anos 80 até meados da década de 90, quando atingiu o máximo de 1083 toneladas capturadas (Figura 2). A partir de

então a tendência foi decrescente, com algumas oscilações, situando-se em 2012 perto das 724 toneladas e em 2016 perto das 776 toneladas.

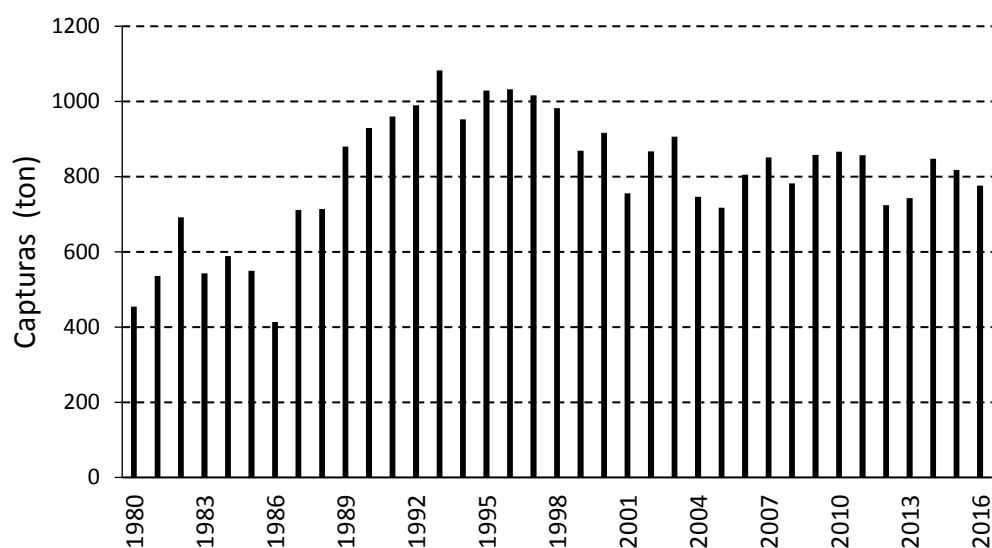


Figura 2. Capturas nominais de *Diplodus* spp., em toneladas, entre 1980 e 2016.

A figura 3 mostra o preço médio por kg de peixe, publicado pelo INE/DGRM para o continente, no período entre 1980-2016, evidenciando uma tendência crescente, tendo-se verificado um ligeiro decréscimo na década de 90, mas que foi restabelecida novamente, embora com pequenas oscilações.

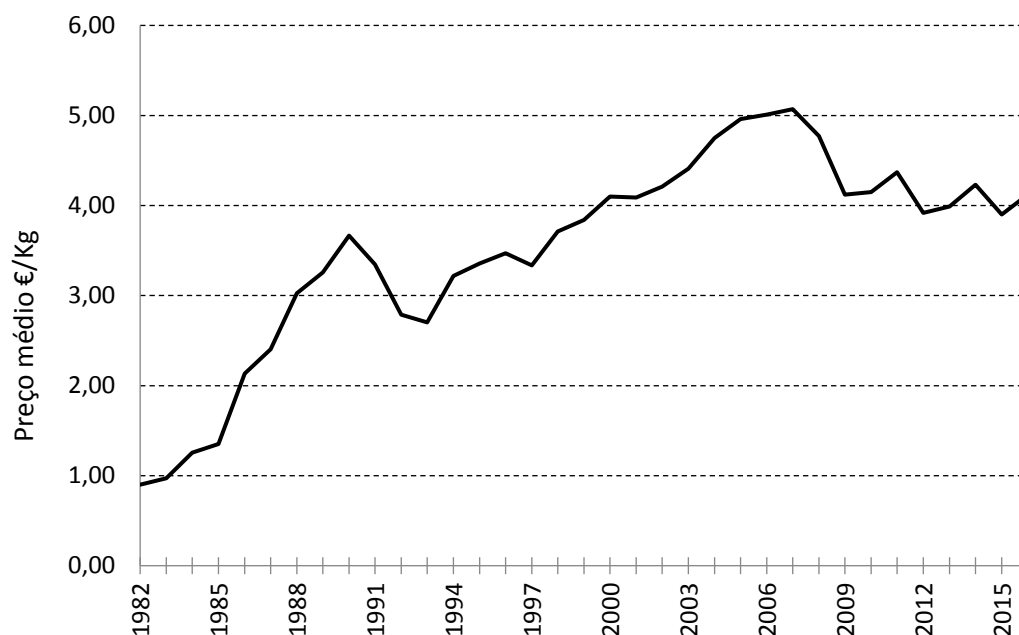


Figura 3. Evolução do preço médio €/kg peixe das capturas anuais de *Diplodus* spp., entre 1982 e 2016.

1.3 *Diplodus bellottii*: conhecimento da espécie e sua atual distribuição e ecologia

Como as demais espécies do género *Diplodus*, *D. bellottii*, com o nome comum Sargo-do-Senegal, apresenta o corpo oblongo ou oval, comprimido dorso-ventralmente elevado posteriormente, com a boca pequena, terminal, ligeiramente protátil permitindo a distensão anterior dos maxilares no momento de ingestão da presa (Nelson, 2006). O focinho e região suborbital não possui escamas, mas estas estão presentes no preopérculo e opérculo. O Sargo-do-Senegal apresenta um comprimento total, em geral, até 30 cm, com uma média de 15 cm. A cor dominante é o cinza-prateado, cabeça escurecida, com ponto escuro no início da linha lateral, um pequeno ponto escuro como sombreado na parte superior da axila peitoral, para além de uma mancha circular preta no pedúnculo caudal. Possui uma listra longitudinal escura, a meio do corpo, ao longo de cada um dos lados. Em cada maxila possui 8 dentes frontais diferenciados em incisivos, 2 (3) séries de molares na parte posterior das maxilas e uma linha de molares logo atrás dos incisivos. Possui arcos branquiais com 12-14 branquispinhas inferiores e 6-9 superiores. Barbatana dorsal X-XI+13-15; barbatana anal III+13-16. Na linha lateral contam-se entre 48-54 escamas até à base da barbatana caudal (Whitehead et al., 1986).

Taxonomia:

Sub-Filo Vertebrata

Ramo Gnathostomata

Sub-Ramo Pisces

Super Classe Osteichthyes

Classe Actinopterygii

Sub Classe Teleostei

Ordem Perciformes

Subordem Percoidei

Família Sparidae

Género *Diplodus* Rafinesque, 1810

Espécie *Diplodus bellottii* (Steindachner, 1882)

D.bellottii é oriundo do Estuário do Rio Sine-Saloum, no Senegal (Figura 4). A sua distribuição está confinada à região do Atlântico Este, desde o Estreito de Gibraltar e Sul de Espanha (Cádiz) a Cabo Verde (Bauchot e Hureau, 1990). No entanto, a espécie está ausente nas Ilhas de Cabo Verde (com.pes. Rui Freitas), assim como nas Ilhas Canárias.



Figura 4. Delta do Rio Sine-Saloum, no Senegal, mapa e foto.

Na literatura, *D.bellottii* é uma espécie nativa desde o Senegal até Cabo Blanco (Mauritânia), de 15°-20°N (Steindachner, 1882; Metzelaar, 1919; Fowler, 1936; Cadenat, 1964; Blanche et al., 1970), descrita ainda para a costa oeste de África (Rucabado et al., 1978), em águas costeiras de pesca do Sahari (Rucabado e Lloris, 1977), e mais recentemente reportada em latitudes mais elevadas ao longo da zona costeira europeia incluindo sul de Espanha nos anos 80, a 36°N (Rodríguez e Rodríguez, 1984; Reina-Hervás e Serrano, 1987), ao longo da costa norte de Marrocos, Golfo de Cádiz e sul de Portugal nos anos 90, a 37°N (Santos et al., 1998) (Figura 5). Com efeito, e de acordo com Santos et al. (1998), é na costa Algarvia que, em Portugal, aparecem as primeiras citações desta espécie. Mais tarde, foi reportada para o Estuário do Tejo, a 38°N, em 1995, e cujo aumento de abundância tem sido reportado como estando ligado com o

aquecimento climático (Cabral et al., 2001). Vinagre et al. (2010) descrevem ainda a sua presença até à latitude da Ria de Aveiro, a 40°N, em 2005.

A distribuição batimétrica desta espécie centra-se entre os 30-100 metros de profundidade. No entanto, são poucos os estudos realizados sobre *D. bellottii* até ao momento. Um dos estudos que incide nesta espécie levou a que Horta et al. (2004) concluíssem que *D. bellottii* apresenta uma elevada sobreposição quer espacial, quer de dieta alimentar com *D. vulgaris*, no estuário do Tejo, o que, por esse facto, resulta numa potencial competição entre as duas espécies. Outros trabalhos fornecem apenas referências sobre a sua ocorrência, dando informação para o tema da distribuição desta espécie (Cabral et al., 2001; Prista et al., 2003; Santos et al., 2005; Leitão et al., 2009; Santos et al., 2011; Vinagre et al., 2010, 2014).



Figura 5. Mapa de ocorrências do *Diplodus bellottii* (Fonte:Fishbase)

1.4 Objetivos da tese

A tese tem dois objetivos fundamentais que, no seu conjunto, procuram contribuir para o melhor conhecimento da espécie:

- 1) Caracterizar a biologia do Sargo-do-Senegal na costa portuguesa;

2) Definir a filogeografia e história demográfica do Sargo-do-Senegal na fração mais a sul do Nordeste Atlântico ao mesmo tempo que se identifica a estrutura populacional.

Para o primeiro objectivo, serão abordados os temas abrangentes da idade e crescimento, e da reprodução de *Diplodus bellottii*. A determinação da idade é essencial para o estudo da dinâmica populacional de espécies comercialmente importantes pelo que se pretende estimar os parâmetros de crescimento pela atribuição de idades e assim, estimar a longevidade para esta espécie bem como a idade à 1ª maturação. Por outro lado, é caracterizada a estratégia reprodutiva, por análise do seu ciclo sexual anual, estimando-se a época de reprodução, o comprimento à 1ª maturação, o rácio sexual e a estratégia de fecundidade da espécie.

Para o segundo objectivo, é desenvolvido o tema da estrutura populacional da espécie, abrangendo duas metodologias: a primeira com recurso à morfologia geométrica do corpo e análise do contorno dos otólitos e segunda pelas técnicas de genética populacional. A identificação de unidades populacionais é o requisito básico para uma correcta avaliação e gestão de um recurso (Begg e Waldman, 1999) e, embora haja várias definições de stock (i.e. Ihssen et al., 1981; Milton e Shaklee, 1987; Hilborn e Walters, 1992), o objetivo passa pelo uso de uma abordagem holística que use diferentes técnicas com base nos mesmos indivíduos, capturados nos diferentes locais durante a época de postura. Só assim se consegue a maximização da correcta definição da estrutura populacional e evitar erros relacionados com a mistura de indivíduos de populações diferentes, resultado de eventuais migrações dentro da área geográfica.

1.5. Plano da tese

Esta tese está dividida em duas partes. A primeira, que se prende com toda a importante e essencial informação biológica, compreende dois capítulos: Idade e Crescimento (capítulo 2), e Reprodução (capítulo 3).

A segunda parte, que se foca na estrutura populacional do Sargo-do-Senegal, abarca duas metodologias: a da Análise dos Parâmetros Morfométricos, com recurso à

morfologia geométrica do corpo e análise do contorno dos otólitos (capítulo 4) e a de técnicas de Análise Molecular, genética de populações, com recurso de um marcador mitocondrial e um marcador nuclear (capítulo 5).

Por fim será apresentado um último capítulo com as considerações finais (capítulo 6)

PARTE 1

PARTE 1

Biologia

CAPÍTULO 2

IDADE E CRESCIMENTO

2.1 Introdução

Quando se refere a idade considera-se a descrição quantitativa do tempo de vida de um organismo e o crescimento é medido pela variação do corpo ou de parte dele, em comprimento ou em peso, entre dois momentos temporais (Casselman, 1987). Avaliar a idade assume um papel determinante nos estudos de crescimento (Bagenal e Tesck, 1978) que reflete a ação concertada dos fatores ambientais (e.g., a temperatura) e dos fatores endógenos (e.g., fatores genéticos) que afetam um organismo (Casselman, 1987).

Há dois grandes grupos de métodos para a avaliação da idade de um organismo aquático: a) os mais frequentemente usados, que recorrem à leitura de estruturas calcificadas associada à análise de frequência de comprimentos e b) os que usam apenas a análise de frequência de comprimentos, também designados de métodos indiretos.

Nos peixes, as estruturas calcificadas como as escamas, os otólitos e ossos crescem geralmente numa taxa que é proporcional ao crescimento somático. Dependendo da estrutura, são sequencialmente depositadas marcas de crescimento diárias, sazonais ou anuais, permitindo extrair informação cronológica para as específicas fases da vida do indivíduo (Panfili et al., 2002). Estas marcas de crescimento são poderosos instrumentos para a identificação de stocks (Cadrin et al., 2014), podendo ser usados na distinção de grupos de peixes com diferentes histórias de crescimento, identificar em que fase do ciclo de vida ocorreu a divergência dos grupos e conseguir a resolução temporal, através da informação que é conseguida por outras técnicas, como a química do otólito.

Os otólitos são as estruturas ósseas mais utilizadas nos teleósteos para a avaliação da idade. Estão localizados no labirinto membranoso do ouvido interno dos peixes (Lecomte-Finiger, 1999), e têm por função manter o equilíbrio do corpo e, de acordo com Degens et al. (1969), registar a profundidade e o som. A sua formação inicia-se num primórdio que é segregado pelo ouvido interno. Em geral estas são as primeiras estruturas calcificadas a serem formadas no decurso da ontogénese (Morales-Nin, 2000; Wright et al, 2002). O processo de calcificação consiste na deposição de carbonato de cálcio, CaCO_3 , numa matriz orgânica. Este processo ocorre num meio acelular, segregado pelo ouvido interno, chamado endolinfa, da qual a calcificação do otólito é estritamente

dependente, pois contém todos os precursores orgânicos e iônicos para a sua formação (Payan et al, 2004). O processo de formação envolve variações rítmicas na deposição e no tamanho das fibras da matriz orgânica e dos cristais de carbonato, o que resulta na formação de anéis macroscópicos translúcidos e opacos além de zonas microscópicas, chamadas de incrementos de crescimento (Morales-Nin, 2000).

Desta forma, nas zonas temperadas, é depositada anualmente no otólito uma zona opaca (correspondente ao período de crescimento rápido) e outra translúcida (referente ao período de crescimento lento, tipicamente nos meses de final do outono, início do inverno). A combinação da zona opaca e da zona translúcida, designada de *annulus*, representa o crescimento de 1 ano e é usado na avaliação da idade em anos (Wright et al, 2002). A determinação da idade não é normalmente validada, para os peixes em geral, mas diversos autores já consideram a validação imprescindível em estudos de idade (Panfili et al., 2002). Para a validação da idade, na impossibilidade de se recorrer a métodos diretos (marcações) devido aos elevados custos inerentes, é comum recorrer-se a métodos semi-diretos de que a análise do incremento marginal é um exemplo. Este método dá informação sobre a sazonalidade da deposição dos incrementos de crescimento, por observação da frequência destes incrementos por mês.

O crescimento duma população é descrito por meio de parâmetros de crescimento (Pilling et al., 2002). Estes parâmetros são incorporados em tradicionais modelos dinâmicos da população, usados no estabelecimento dos níveis de exploração sustentável dos stocks de peixes (Beverton e Holt, 1957).

A equação de von Bertalanffy é vulgarmente utilizada na descrição do crescimento de peixes marinhos precisamente pela sua facilidade de incorporação noutros modelos, além de possuir um alto ajuste a inúmeras espécies (King, 1995; Jennings et al, 2001). A equação é expressa por

$$L_t = L_{\infty} (1 - e^{-k(t-t_0)})$$

sendo que L_t é o comprimento médio à idade t , L_{∞} é o comprimento assintótico, que representa o comprimento máximo que a população pode atingir, k é a constante de crescimento e t_0 é a idade que o indivíduo teria se o seu comprimento fosse zero.

2.2 Material e métodos

No âmbito do estudo do crescimento, foram capturados e amostrados mensalmente 25-30 exemplares, na região de Lisboa, quer no estuário do Tejo, quer no estuário do Sado, entre outubro de 2011 e abril de 2015 (exceto em alguns meses em que as condições climáticas não o permitiram), obtidos por diferentes artes de pesca: xávega, redes de emalhar, arrasto e aparelho de anzol. No laboratório, o comprimento total (Lt, aproximação a 0,1cm) e comprimento standard (Lst, aproximação a 0,1cm), o peso total (Wt, aproximação 0,1g) foram anotados bem como o sexo dos indivíduos.

- Rácio-sexual por comprimento

Para investigar o significado das diferenças encontradas entre frequências de machos e fêmeas (rácio-sexual diferente de 1:1) por classe de comprimento, foi aplicado o teste de Qui-quadrado (Legendre e Legendre, 1998).

- Relação Comprimento-Peso

A relação entre Lt (cm) e Wt (g) foi calculada segundo a função: $Wt = a \times Lt^b$.

O Teste t-Student foi usado para verificar a existência de diferenças significativas entre os sexos e testar a presença de alometria na relação comprimento-peso (Zar, 1996).

- Atribuição de idades e validação

Dos 3 pares de otólitos apenas os *sagitta* (os maiores e mais facilmente usados neste tipo de estudos) foram removidos, limpos dos restos da *maccula*, secos e armazenados em tubos plásticos, respetivamente etiquetados (Panfili et al, 2002):

- a) Interpretação dos padrões de deposição e leitura da idade

Foram observados à lupa binocular (ampliação 18X) os otólitos direitos de cada par, imersos numa mistura de glicerina e etanol em partes iguais e lidos, usando luz refletida sob fundo escuro. A idade foi estabelecida como o número de incrementos translúcidos, contados na face oposta ao *sulcus acusticus*, desde o núcleo até à margem da região posterior (Panfili et al, 2002). A cada peixe foi atribuído uma classe de idade assumindo-se o dia 1 de Janeiro como data de nascimento (Hile, 1950).

Uma subamostra de 30 otólitos (cobrindo todas as classes de comprimento e ambos os sexos) foi lida por dois leitores por forma a estabelecer um padrão de leitura e interpretação e assegurar a consistência nas leituras (Campana, 2001). A média da percentagem de erro (APE) (Beamish e Fournier, 1981), o coeficiente de variação (CV) (Chang, 1982), e o índice de precisão (D) (Chang, 1982) foram usados para comparação de idades lidas entre leitores. APE e CV produzem valores semelhantes (Chang, 1982), mas D é estatisticamente mais rigoroso e, portanto, mais flexível (Campana et al., 1995). A avaliação dos desvios baseia-se nas parcelas dos desvios de idade (Campana et al., 1995) o que permite a visualização dos desvios das leituras de idade.

b) Validação da periodicidade de formação dos anéis

Para validar a sazonalidade da deposição dos incrementos, foram observadas por mês a frequência relativa da deposição de zonas opacas e translúcidas na margem dos otólitos observados (Beckman e Wilson, 1995; Panfili e Morales-Nin, 2002).

A deposição foi ainda validada quantitativamente pela análise do incremento marginal (Samamé, 1977). Esta validação semidirecta consiste na observação da evolução da zona marginal da estrutura calcificada ao longo do tempo e pelo cálculo do incremento marginal. As distâncias do núcleo aos dois últimos incrementos translúcidos, foram medidas com o auxílio dum micrómetro sendo ainda anotado o tipo de margem que os otólitos apresentam, se translúcido, se opaco. A taxa de incremento marginal ou MIR obtém-se pela razão da distância marginal absoluta (distância que separa a última marca da extremidade) e da distância que separa as 2 últimas marcas ($D_i, i-1$). Foram analisadas as médias mensais do MIR.

- Modelos de crescimento

Após atribuição da idade e elaboração da chave comprimento-idade foi então aplicado o modelo de crescimento de von Bertalanffy, separadamente para machos e fêmeas, de acordo com a seguinte equação:

$$L_t = L_{\infty} [1 - e^{-k(t-t_0)}]$$

e usando o software **R** i386 v.3.1.1., recorrendo aos “packages Boot”, “Foreign” e “Fishmethods” (Nelson, 2013). Para avaliar a significância das diferenças dos parâmetros de crescimento entre os sexos usou-se o teste da razão de máxima verossimilhança

(Kimura, 1980) e o critério de informação Akaike (AIC) foi usado para avaliar o ajustamento do modelo.

2.3 Resultados

- Rácio-sexual por comprimento

De um total de 665 indivíduos amostrados, 369 eram fêmeas (55,5%), com Lt compreendido entre 8,3 e 22,5cm e, os restantes indivíduos, 296, machos (44,5%), com Lt entre 9,7 e 24cm. Apesar do rácio sexual (M:F) ser 0,8:1, diferente de 1:1 ($\chi^2=8.0135$; $df=1$; $p=0.0046$), na figura 6 foram observados diferentes padrões na relação macho-fêmea ao longo das diferentes classes de comprimento, sendo possível visualizar 3 grupos: 8-12cm; 13-18cm; 19-24cm.

No primeiro grupo, há uma semelhança no número de machos e fêmeas por classe de comprimento conforme mostram os resultados do teste qui-quadrado ($\chi^2=0.037$; $df=1$; $p=0.84$); nas classes entre 13-18cm já é significativa a diferença entre machos e fêmeas, com predominância das fêmeas 0,67:1 ($\chi^2=19.23$; $df=1$; $p=0.000012$) e nas classes 19-24cm observa-se também uma significativa diferença do rácio, mas com inversão deste, ou seja, com dominância de machos 1,6:1 ($\chi^2=6.644$; $df=1$; $p=0.0099$).

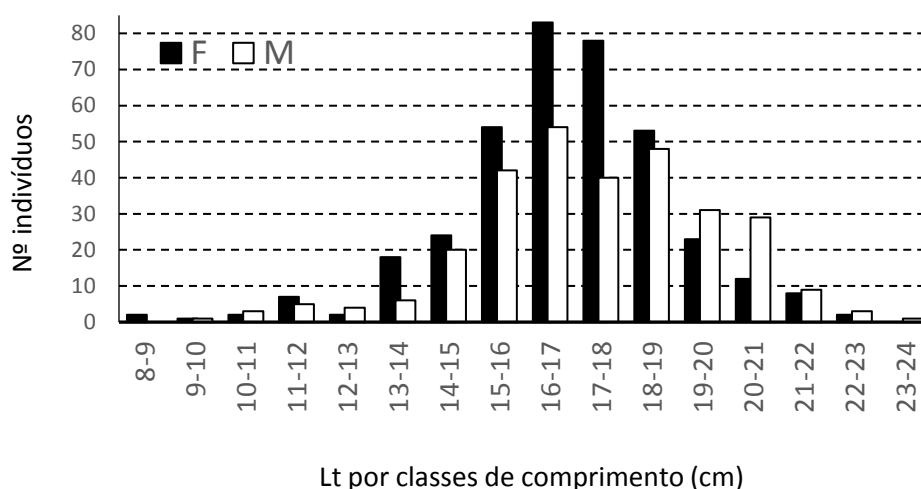


Figura 6. Distribuição de frequência de comprimentos, segundo o sexo, de *D. bellottii* na região centro de Portugal.

- Relação Comprimento-Peso

As equações que expressam a relação Comprimento-Peso para o Sargo-do-Senegal são:

$Pt = 0.006 \times Lt^{3.3365}$, $r = 0.975$ para as fêmeas e $Pt = 0.0078 \times Lt^{3.2435}$, $r = 0.967$ para os machos.

As figuras 7 e 8 representam essa relação para as fêmeas e para os machos, respetivamente. Ambos os sexos apresentam crescimento alométrico positivo (resultados T-teste; Fêmeas: T-teste =81.41; df=367, $p < 0.0001$; Machos: T-teste =60.5, df=294, $p < 0.0001$).

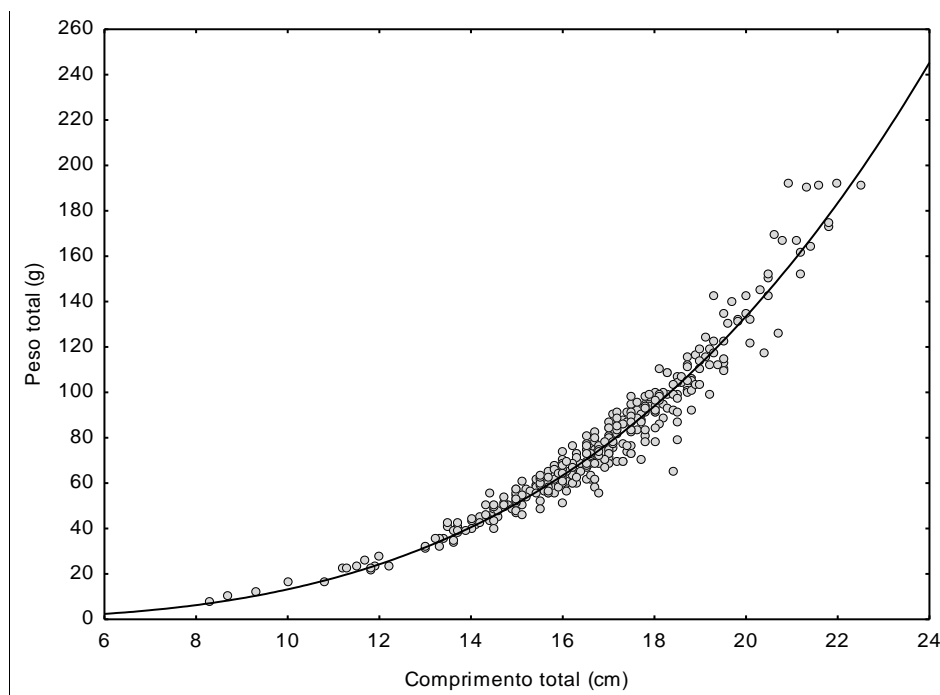


Figura 7. Relação Comprimento–Peso para fêmeas de *D.bellottii*, na região centro de Portugal.

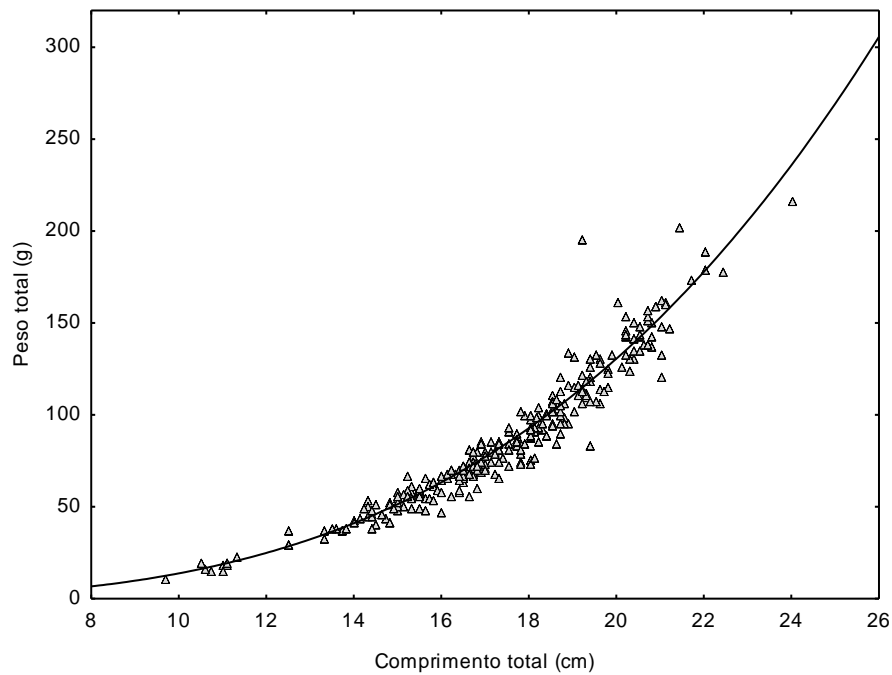


Figura 8. Relação Comprimento-Peso para machos de *D. bellottii*, na região centro de Portugal.

- Atribuição de idades e validação
 - a) Interpretação dos padrões de deposição e leitura da idade

Os otólitos do Sargo-do-Senegal mostram o típico padrão observado nos teleósteos, um padrão regular nitidamente visível, com alternância de incrementos de crescimento concêntricos, opacos e translúcidos, que se depositam ao redor de um núcleo largo e opaco. Verifica-se, no entanto, que as primeiras duas a três zonas opacas são na realidade falsos anéis de crescimento. O padrão de deposição dos incrementos varia com o crescimento do otólito: na região mais perto do núcleo, os anéis são mais largos, normalmente os 4 primeiros (Figura 9), sendo que a partir daí passam a ser mais finos e mais juntos.



Figura 9. Otólito *sagitta* de *Diplodus bellottii* da região centro de Portugal, mostrando o padrão de deposição de anéis para um macho com 4 anos e 15,5cm de comprimento total.

Foram efetuadas duas leituras de todos os otólitos e um segundo leitor determinou a idade duma subamostra representativa de 30 destes. Na tabela 1 apresentam-se os índices de precisão da leitura de idades entre leitores.

Tabela 1. Índices de precisão da leitura de idades em otólitos de *Diplodus bellottii* da região centro de Portugal.

Índice	Entre leitores
APE (%)	2,23
CV (%)	3,12
D (%)	2,23

APE- percentagem de erro média, CV- coeficiente de variação, D- índice de precisão

b) Validação da periodicidade de formação dos anéis

A análise de incidência de zonas opacas e translúcidas nas margens dos otólitos sugere que os incrementos de crescimento se formam anualmente, sendo que os anéis opacos se

formam predominantemente nos meses de primavera e verão, e os translúcidos nos meses de outono e inverno. Assim, a margem opaca é mais frequente entre abril a setembro, enquanto as margens translúcidas predominam entre os meses outubro a março (Figura 10).

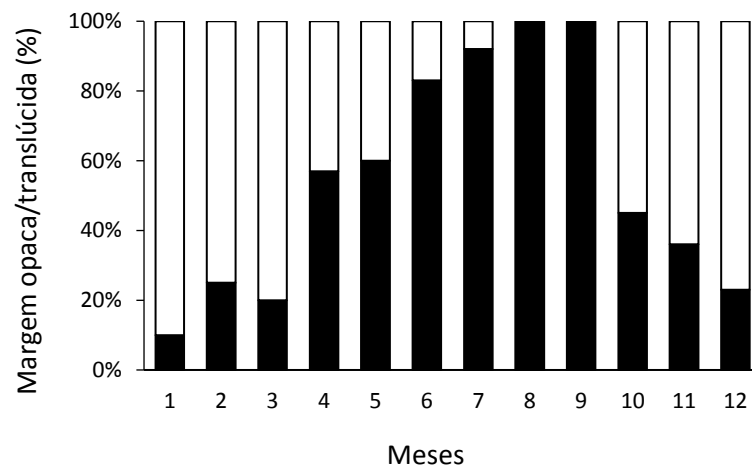


Figura 10. Padrão de variação mensal da porcentagem de margem opaca (escuro) e translúcida (branca) nos otólitos de *Diplodus bellottii*.

A taxa de incremento marginal (MIR) por mês é apresentada na figura 11.

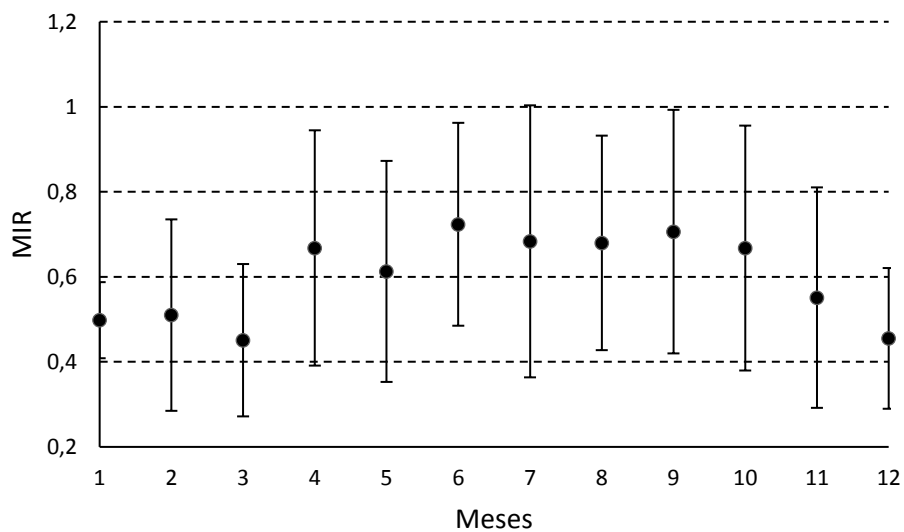


Figura 11. Evolução mensal da taxa de incremento marginal em *D. bellottii*.

O MIR corrobora o padrão anual de formação dos incrementos detetado na análise qualitativa da margem do otólito, com valores superiores nos meses de abril a outubro, e com valores mais baixos de novembro a março. Estes dados corroboram a formação anual de duas zonas de crescimento, uma opaca e uma translúcida, o que permite que as idades sejam atribuídas por contagem das zonas translúcidas.

- Modelo de crescimento

Os otólitos dos 665 indivíduos foram processados, sujeitos a leitura, tendo como objetivo a avaliação da idade. A amostragem utilizada foi relativamente ampla, tendo reunido exemplares de comprimentos inferiores a 10cm até 25cm, o que se traduziu em 10 grupos de idade. A idade máxima observada para ambos os sexos foi de 9 anos (indivíduos com 21,8cm Lt para as fêmeas e 24cm Lt para os machos). As chaves de Comprimento-Idade para fêmeas e machos apresentam-se nas tabelas 2 e 3, respetivamente.

Tabela 2. Chave Comprimento-Idade para fêmeas de Sargo-do-Senegal, *Diplodus bellottii*, amostrados na região centro de Portugal, para o período 2011-2015.

Lt(cm)	classe idade (anos)									
Fêmeas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	n
8-9	2									2
9-10	1									1
10-11		2								2
11-12	3	4								7
12-13	1	1								2
13-14		10	7	1						18
14-15		5	15	2	2					24
15-16		1	21	19	10	2		1		54
16-17			7	32	35	8	1			83
17-18			1	12	31	28	6			78
18-19			1	4	21	20	7			53
19-20					3	7	10	3		23
20-21				1	2		8		1	12
21-22					3	2	2		1	8
22-23							1	1		2
n	7	23	52	71	107	67	35	5	2	369
Média	10,44	13,08	15,07	16,34	17,22	17,89	19,25	19,14	21,15	
SD	1,61	1,35	1,02	1,09	1,29	1,14	1,33	2,69	0,92	

Lt = comprimento total

n = número de ind.

Média (cm) = média do comprimento total

SD (cm) = desvio-padrão

As estimações do comprimento à idade ajustaram-se bem ao modelo de von Bertalanffy. De entre os métodos de estimação dos parâmetros de crescimento, escolheu-se o ajuste não linear aplicado a todos os pares de comprimentos à idade, sendo esta corrigida pela data de captura. Para além do maior rigor desta análise, os resultados produzidos foram considerados os mais aproximados à realidade. A tabela 4 apresenta os valores dos parâmetros de crescimento de von Bertalanffy bem como o valor do AIC e as figuras 12 e 13, as curvas de crescimento, respetivamente para fêmeas e machos. Diferenças significativas nos parâmetros de crescimento entre machos e fêmeas foram encontradas (Teste de máxima verosimilhança: $\chi^2=9.60$; $df=3$; $p=0.022$).

Tabela 3. Chave Comprimento-Idade para machos de Sargo-do-Senegal, *Diplodus bellottii*, amostrados na região centro de Portugal, para o período 2011-2015.

Lt(cm)	classe idade (anos)									
Machos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	N
9-10	1									1
10-11	1	2								3
11-12	1	4								5
12-13		3		1						4
13-14		3	1	2						6
14-15		6	10	2	2					20
15-16		2	10	20	10					42
16-17			4	19	27	4				54
17-18				5	20	12	3			40
18-19			1	4	22	14	7			48
19-20				2	7	14	8			31
20-21					6	8	12	3		29
21-22					2	2	3	2		9
22-23							2	1		3
23-24									1	1
<i>n</i>	3	20	26	55	96	54	35	6	1	296
Média	10,5	13,02	15,20	16,15	17,56	18,73	19,74	20,97	24	
SD	0,72	1,64	1,02	1,29	1,47	1,32	1,27	0,59		

Lt = comprimento total

n = número de ind.

Média (cm) = média do comprimento total

SD (cm) = desvio-padrão

Tabela 4. Resumo dos parâmetros de von Bertalanffy estimados para o Sargo-do-Senegal, *Diplodus bellottii*, na região centro de Portugal. (o erro-padrão é apresentado entre parêntesis).

Sexo	L_{∞} (cm)	k (ano ⁻¹)	t_0 (anos)	n	Idad	L(cm)	AIC
					e		
Fêmeas	22,07 (0.95)	0,21 (0.03)	-2,17 (0.46)	36 9	0-9	8,3- 21,8	1154.7 6
Machos	26,35 (2.78)	0,14 (0.04)	-2,9 (0.79)	29 6	0-9	9,7-24	1022.9 4

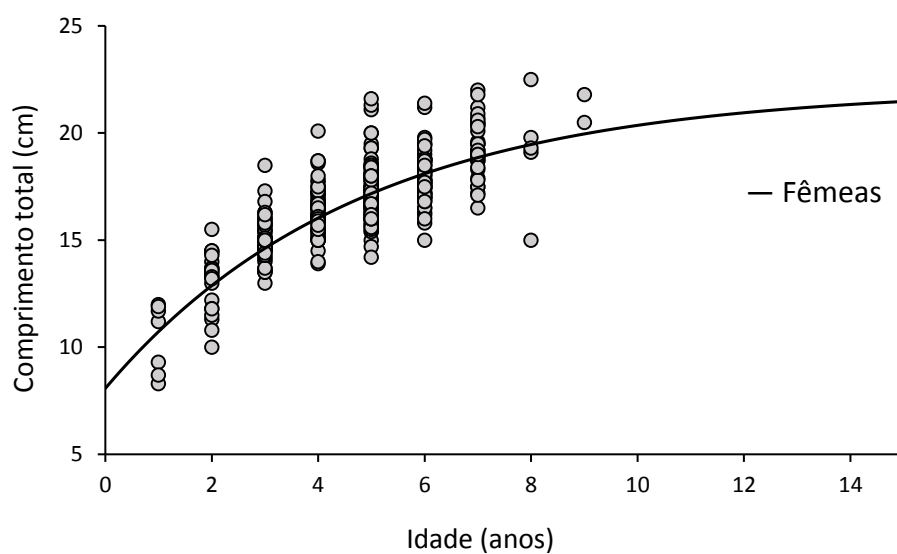


Figura 12. Modelo de crescimento de von Bertalanffy para fêmeas ($n=369$) de Sargo-do-Senegal, *Diplodus bellottii*, na região centro de Portugal.

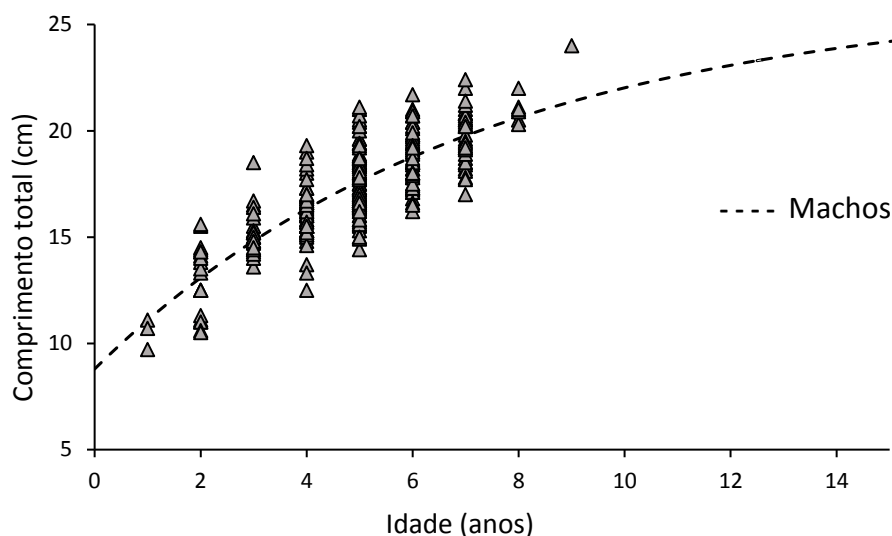


Figura 13. Modelo de crescimento de von Bertalanffy para machos ($n=296$) de Sargo-do-Senegal, *Diplodus bellottii*, na região centro de Portugal.

2.4 Discussão

Este trabalho é o primeiro que aborda o estudo da idade e crescimento de *Diplodus bellottii*. De uma maneira geral, foi encontrada uma clara predominância de fêmeas relativamente aos machos (0.8:1), entre os indivíduos capturados nas diversas amostragens efetuadas, ou seja, uma alteração do equilíbrio esperado. Este padrão foi encontrado para outras espécies de *Diplodus spp.*: *D.sargus sargus* da costa de Algeria (Benchalel e Kara, 2013), *D. puntazzo* nas Ilhas Canárias (Pajuelo et al., 2008) e no Mar Adriático (Kraljević et al., 2007), *D. sargus cadenati* no arquipélago das Canárias (Pajuelo e Lorenzo, 2004), *D. cervinus cervinus* no arquipélago das Canárias (Pajuelo et al., 2003a). Da análise do rácio-sexual por classe de comprimento é evidenciado um desequilíbrio desta proporção em função do tamanho. Tal denuncia que algum fator é o reponsável por essa alteração ao equilíbrio. Um importante fator a analisar é a taxa de crescimento por sexo. A diferenciação do crescimento por sexo pode causar esse desequilíbrio. A taxa de crescimento mais rápido das fêmeas nas classes de comprimento medianas (13-18cm) leva a que nestas classes sejam as fêmeas as menos sujeitas a predação, relativamente aos machos com taxa de crescimento mais lento. Por seu lado, nas classes de maiores comprimentos (19-24cm), são os machos os que atingem a maior taxa de crescimento e os que aparecerem como mais representativos, igualmente menos sujeitos à predação comparativamente às fêmeas, de tamanho menor. Adicionalmente, se

existe essa diferença de tamanho entre machos e fêmeas, numa determinada fase, a arte de pesca pode fazer deslocar numa direção, resultando numa captura diferenciada de determinado sexo, com modificação da composição sexual do stock (Nikolsky, 1963).

Relativamente à relação comprimento-peso, ambos os sexos apresentam crescimento alométrico positivo. De entre os sparídeos, casos há em que se verifica crescimento isométrico, como no *D. sargus sargus* (Benchalel e Kara, 2013) e *D. puntazzo* (Kraljević et al., 2007).

Em algumas espécies de sparídeos a avaliação da idade mostrou ser dificultada pelo empilhamento das zonas de crescimento em direção à margem do otólito, especialmente em indivíduos mais velhos (van der Walt e Beckley, 1997). Nesta espécie, este fenómeno não teve uma repercussão significativa, e dado a translucidez dos otólitos, praticamente não houve preocupação ou dúvida na leitura destes. Os valores dos índices de precisão obtidos entre leitores foram baixos, o que transmite confiança nos resultados obtidos. Com efeito, os valores dos índices ficaram abaixo dos 5%, valor de referência considerado como limite aceitável para leituras de otólitos por Campana (1995). Verifica-se, como se disse anteriormente, que as primeiras duas a três zonas opacas são na realidade falsos anéis de crescimento, os quais poderão corresponder ao período de assentamento das larvas, ao início da alimentação por parte da larva, ou mesmo ainda a evidência da migração por elas efetuada, não correspondendo necessariamente a um período anual (Panfili et al., 2002).

A validação de idades é importante em estudos de idade e crescimento, já que é costume uma subestimação da idade em espécies longevas, e assim uma sobrestimação da taxa de crescimento, o que trará implicações certamente numa gestão de stocks e estratégias de pesca demasiado otimistas (Beamish e McFarlane, 1983; Campana, 2001; Cailliet e Andrews, 2008). Como tal, o MIR e a análise marginal confirmaram a hipótese de um incremento translúcido e opaco se formarem anualmente no Sargo-do-Senegal da costa continental portuguesa. Resultados semelhantes foram encontrados em *Diplodus sargus cadenati* por Pajuelo e Lorenzo (2002a) ao largo das lhas Canárias, em *Diplodus vulgaris* por Gonçalves et al. (2003) na costa setentrional de Portugal continental, em *Diplodus cervinus cervinus* por Pajuelo et al. (2003a) e *Diplodus puntazzo* por Domínguez-Seoane et al. (2006) na costa das Ilhas Canárias. Tais ciclos de crescimento sazonais podem estar relacionados com alterações fisiológicas produzidas por fatores como temperatura ou disponibilidade alimentar (Morales-Nin, 1989), tendo Longhurst e

Pauly (1987) estudado a hipótese da sua formação nas estruturas usadas para atribuir idades nos peixes e que pode requerer alterações sazonais de pelo menos 4°C.

Este estudo mostra que a idade máxima atingida por esta espécie, na área amostrada, é 9 anos, em indivíduos acima dos 20cm. Também Man-Wai e Quignard (1984) encontraram esta idade máxima em *D. sargus sargus* no Mediterrâneo-Golfo de Léon. Outros autores encontraram idades sensivelmente semelhantes em *D.sargus*, *D.vulgaris* e *D.annularis* no Mediterrâneo- Costa Catalã (Gordoa e Molí, 1997).

Apesar do comprimento total máximo encontrado para os machos ser 24 cm, e se encontrar aquém do estimado 26,35cm, nas fêmeas o Lt máximo encontrado, 22,5cm, está perto do estimado 22,07. Muito embora seja o primeiro estudo nesta espécie, estudos em espécies do mesmo género mostram comprimentos assintóticos semelhantes quer para *D. vulgaris* no Algarve (Abecassis et al, 2008) e Mediterrâneo (Girardin, 1978) e também para *D. sargus* (Girardin, 1978). É de apontar que tais idades mínimas e máximas encontradas, assim como os parâmetros de crescimento de von Bertalanffy estimados, estão relacionadas com os tamanhos amostrados, por sua vez dependentes da arte de pesca utilizada. Dependendo da malhagem usada nas redes ou do uso do aparelho por anzol, a eficiência na captura de indivíduos de menores ou maiores dimensões pode estar comprometida. O uso de diferentes artes de pesca conseguido neste estudo pretendeu que a amostragem fosse o mais abrangente possível.

Os parâmetros de crescimento de von Bertalanffy determinados para a espécie mostram tratar-se de uma espécie de crescimento moderado o que, comparativamente a outras espécies de sargos, revela que os machos atingem um maior tamanho, crescendo mais lentamente que as fêmeas, o que não se verifica em trabalhos relativos a outras espécies de sargos já citados anteriormente.

CAPÍTULO 3

REPRODUÇÃO

3.1 Introdução

Cada espécie evoluiu como resposta a um conjunto único de pressões seletivas, daí que possuam frequentemente diferentes estratégias da sua história de vida. Cada estratégia é um conjunto de adaptações de desenvolvimento que permite à espécie atingir sucesso evolutivo (Miller e Kendall Jr, 2009). A seleção natural conduz à maximização da produção da descendência, mas mais importante ainda, à sua sobrevivência até que atinja a fase adulta (Murua e Saborido-Rey, 2003).

Estando a evolução de uma determinada espécie de peixe dependente de um conjunto único de condições ecológicas, a sua estratégia reprodutiva é também única, com adaptações especiais como as anatómicas, de desenvolvimento, de comportamento, fisiológicas e energéticas (Miller e Kendall Jr., 2009). É este processo evolutivo que propicia a perpetuação da espécie. Quase todos os peixes se reproduzem sexualmente, permitindo a mistura de genes de ambos os sexos. São, pois, os processos reprodutivos dos peixes que formam a base da grande maioria dos estudos sobre a primeira fase da sua história de vida. E é a grande variedade destes processos reprodutivos, que as diferentes espécies exibem, que torna o seu estudo imprescindível, mas também determina como estes devem ser conduzidos. Como exemplo, há peixes que se reproduzem em ambiente marinho, outros em água doce; uns possuem fertilização externa outros, interna; possuem um curto período reprodutivo anual ou produzem gâmetas em intervalos regulares ao longo do ano.

Os peixes possuem uma vasta gama de formas de sexualidade e por isso são inúmeros os estudos que visam responder a perguntas como: se a determinação do sexo e a diferenciação sexual são consequência do ambiente ou da hereditariedade? Podem exibir hermafroditismo, unissexualidade (partenogénese), sexos separados (gonocorismo) ou uma combinação destes anteriores processos sexuais (Miller e Kendall Jr, 2009). Os sparídeos são caracterizados por variadas formas de hermafroditismo, incluindo protandria, protoginia e hermafroditismo rudimentar (Buxton e Garratt, 1990). A maioria das espécies de peixes são gonocóricas, não possuem dimorfismo sexual, exibem fertilização externa sem cuidados parentais, são ovíparas e reproduzem-se mais

do que uma vez durante a sua vida (Murua e Saborido-Rey, 2003). No que respeita ao número de posturas que efetuam, as espécies são classificadas como semélparas, quando desovam uma única vez e morrem de seguida (e.g. enguia e algumas espécies de salmão), ou iteróparas, quando efetuam várias posturas ao longo da vida. Relativamente à forma como se processa a emissão dos oócitos, as espécies são classificadas como: reprodutores totais, quando os oócitos se formam e se desenvolvem em conjunto, maturam e são libertados num intervalo de tempo mais ou menos curto; reprodutores parciais, quando os oócitos se formam e se desenvolvem em fornadas (“*batches*”), as quais vão sendo libertadas à medida que maturam (como não se verifica qualquer sincronia no desenvolvimento dos oócitos, são designados de assíncronos ou heterócronos). Há dois tipos de assincronia, um em que se destacam claramente os vários grupos de oócitos, em diferentes estados de desenvolvimento e em que é possível determinar o tamanho da postura antes da época de postura (reprodutores determinados), e o outro onde não é possível fazer esta distinção, uma vez que há sempre novos oócitos a iniciar o seu desenvolvimento (reprodutores indeterminados) (Jakobsen et al., 2009). O conhecimento da estratégia reprodutiva e do padrão de desova é essencial para compreender a dinâmica populacional de toda a espécie de peixes (Hilborn e Walters, 1992; Richard e Kestenmont, 2003) e promover assim uma antevisão de sustentabilidade das pescas.

Neste trabalho o tipo de organização do desenvolvimento ovário é classificado de acordo com Wallace e Selman (1981) e Tyler e Sumpter (1996) e o tipo de fecundidade é avaliado tendo por base 4 linhas de evidência como sugerido por Hunter et al. (1992), Greer Walker et al. (1994) e Murua e Saborido-Rey (2003): distribuição de frequências do tamanho dos oócitos; número de oócitos pré-vitelogénicos e vitelogénicos; o diâmetro médio dos oócitos vitelogénicos avançados; intensidade da atresia durante a época de desova.

Como o crescimento representa a integração da alimentação, assimilação e aporte de energia, durante um certo período de tempo, um fraco crescimento resulta numa menor energia disponível para a reprodução que por sua vez leva à redução da condição dos indivíduos, conduzindo a um decréscimo inevitável da sua população. Assim, o crescimento e a reprodução são indicadores, integrados no tempo, do bem-estar físico geral do organismo. Este valor da condição de saúde dos organismos pode ser avaliado pela análise do fator de condição (K) e dos índices gonadosossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) (Hadj Taieb et al., 2012; Mouine et al., 2011).

Os estudos do ciclo reprodutivo das espécies exploradas são fundamentais, entre outros, para o estabelecimento da época de reprodução e da ogiva de maturação, e consequentemente, com a estimativa do tamanho e idade da maturação sexual. O período reprodutivo duma determinada espécie é obtido pela análise da variação mensal dos estádios de maturação das gónadas que os indivíduos apresentam, assim como do seu IGS (Mouine et al., 2007; Gonçalves e Erzini, 2000; Pajuelo et al., 2006), já que se trata duma relação do tamanho da gónada com o tamanho do indivíduo. Juntamente com este índice, também o IHS e o K podem ser utilizados como indicadores do período reprodutivo das espécies. O IHS, definido como a razão entre o peso do fígado e o peso do indivíduo, fornece indicação sobre o estado de reservas de energia do indivíduo, necessárias para o processo de vitelogénese, reprodução ou até na preparação para o período de inverno (Querol et al., 2002.), sendo que, em ambientes empobrecidos, os peixes possuem normalmente fígados de menor tamanho (com menores reservas energéticas). O K, calculado pela relação entre o peso observado e o peso teórico do indivíduo, é um importante indicador da condição de bem-estar do peixe e o seu valor reflete os aspetos nutricionais recentes ou gastos das reservas em atividades cíclicas, sendo possível relacioná-lo às condições ambientais e aos aspectos comportamentais das espécies (Vazzoler, 1982). Elevados valores do fator de condição refletem boa qualidade ambiental. Os valores do fator de condição podem sofrer alterações em função dos fatores intrínsecos (reservas orgânicas, maturação sexual e tamanho dos exemplares) e extrínsecos (disponibilidade alimentar, temperatura, fotoperíodo, entre outros) (Gurgel, 2004). A variação desse índice ao longo do ano pode ser utilizada como dado adicional ao estudo dos ciclos sazonais dos processos de alimentação e de reprodução (Braga, 1986).

3.2 Material e métodos

Para a análise da estratégia reprodutiva foram observados 25-30 indivíduos, que foram capturados e amostrados mensalmente, na região de Lisboa, quer no estuário do Tejo, quer no estuário do Sado, desde outubro de 2011 a abril de 2015. Em laboratório, os indivíduos foram medidos (comprimento total, Lt, com a aproximação ao mm) e pesados (peso total, Ptot, e peso eviscerado, Pevisc, com a aproximação ao cg). As gónadas foram observadas macroscopicamente, sendo-lhes atribuído um estágio de maturação, recorrendo à classificação macroscópica em 5 estádios de desenvolvimento

para gónadas femininas e masculinas (Brown-Petersen *et al.* 2011) (Apêndices 1 e 2, respetivamente). Seguidamente, foram removidos e pesados a gónada (Wgon) e o fígado (Wfig) com a aproximação ao cg, assim como o indivíduo após a remoção de toda a parte visceral (Wevisc). Por fim, as gónadas foram fixadas numa solução de formalina a 10% tamponada, a que se seguiu o procedimento padrão de técnicas histológicas (Bancroft e Gamble, 2002), inclusão em resina Technovit7100, realização de cortes histológicos com 3 a 5 µm e montagem em lâminas e coloração com azul de toluidino. Apenas no que respeita às gónadas femininas, e como forma de determinar se o desenvolvimento celular na porção média do ovário era representativo de todo o ovário, foram cortadas secções do ovário nas regiões anterior, média e posterior, que seguiram o procedimento histológico acima referido. Não tendo sido encontradas diferenças na distribuição de frequência de tamanho dos oócitos nas diferentes regiões do ovário, a análise prosseguiu usando as secções da região central do ovário, que foram digitalizadas usando um sistema de análise de imagem visual (Leica DFC 290).

Estas lâminas foram observadas ao microscópio ótico para classificação histológica de acordo com o estágio de desenvolvimento das estruturas celulares presentes (West, 1990) e o estágio de maturação atribuído de acordo com a classificação microscópica em 5 estádios de desenvolvimento (Brown-Petersen *et al.*, 2011) (Apêndices 1 e 2).

Foram ainda analisados os índices gonadosomático (IGS) e dois índices bioenergéticos, o índice hepatossomático (IHS) e o fator de condição de Fulton (K), calculados para ambos os sexos, para avaliar a condição dos indivíduos:

$$\text{IGS} = \text{Wgon} / \text{Wevisc} * 100$$

$$\text{IHS} = \text{Wfig} / \text{Wevisc} * 100$$

$$\text{K} = \text{Wevisc} / \text{Lt}^3 * 100$$

Para estabelecer as ogivas de maturação de machos e fêmeas, todos os indivíduos capturados nos meses correspondentes à época de reprodução e que apresentassem um desenvolvimento compatível com o estágio de maturação 2 ou superior foram considerados maduros. Assim, à proporção de indivíduos maduros por classe de comprimento (1cm), por sexo, foi ajustado um modelo logístico.

$Y = \frac{1}{1+e^{(-1(a+b*Lt))}}$, onde Y é a proporção de indivíduos maduros na amostra, Lt é o comprimento total e a e b são parâmetros do modelo.

A partir da percentagem de indivíduos maduros por classe de comprimento, durante a época de reprodução, foram construídas as curvas de maturação para a espécie.

Com base nas curvas de maturação, determinou-se o comprimento à 1ª maturação, correspondendo ao tamanho em que 50% dos exemplares estão maduros (L_{50}), durante a época de postura. O ajuste das curvas de maturação foi realizado pelo método de ajuste não linear ponderado dos mínimos quadrados, aplicado à curva logística:

$$P = \frac{1}{1+e^{-b(L-L_{50})}}$$

onde P é a proporção de indivíduos maduros por comprimento (L); b é o declive da curva e L_{50} é o comprimento médio de 1ª maturação. A análise estatística foi realizada no Statistica 12.0 (StatSoft Inc.) e *software R* versão 3.2.1, definindo como nível de significância 0,05.

Para estimar as alterações no tamanho e número de oócitos pré-vitelogénicos (oócitos com alvéolos corticais) e oócitos vitelogénicos (com grânulos no vitelo) durante a época de desova, foram analisadas imagens digitais de secções histológicas, quando possível a distinção celular e a sua contagem (entre alvéolos corticais, vitelogénicos e atréticos). Como critério metodológico usado foram consideradas 3 secções por fêmea, visualizando toda a distribuição oocitária entre o lúmen e a parede ovárica, sendo apenas contabilizados e medidos os oócitos com núcleo visível, usando o Image-ProPlus software. Os oócitos hidratados, dada a sua forma extremamente irregular, o que torna a medição do diâmetro muito subjetiva, não foram medidos. A intensidade relativa de atresia, definida como a percentagem de oócitos vitelados alfa-atréticos relativamente ao número total de oócitos vitelados num ovário, foi medida em secções histológicas de fêmeas em desova.

Relativamente à determinação do tipo de fecundidade, baseando em quatro linhas de evidência, como sugerido por Hunter et al. (1992), Greer Walker et al. (1994) e Murua e Saborido-Rey (2003): 1-distribuição de frequências do tamanho oocitário; 2-número de oócitos pré-vitelogénicos e vitelogénicos no ovário; 3- diâmetro médio de oócitos vitelogénicos avançados; 4- incidência de atresia, ao longo da época de desova. Foi

aplicado o teste de Kruskal-Wallis para comparar o número de oócitos alvéolos corticais, oócitos vitelogénicos e a análise de variância, ANOVA, para comparação dos tamanhos do diâmetro médio dos oócitos vitelogénicos durante a época de desova. A assunção de normalidade e homogeneidade da variância foi examinada usando o teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste de Leveness, respetivamente. A subsequente comparação de médias foi realizada com testes de Scheffe. O programa Statistica 13.0 foi utilizado para as análises estatísticas e também o software RStudio e R i386 3.4.2.

3.3 Resultados

Durante o período de amostragem que se prolongou de outubro 2011 a abril 2015, obtiveram-se no total 665 indivíduos amostrados, dos quais 369 fêmeas (55,5%), com Lt compreendido entre 8,3 e 22,5cm, e os restantes indivíduos, 296 machos (44,5%), com Lt entre 9,7 e 24cm. Este extenso período de amostragem foi necessário para a caracterização com precisão do ciclo anual reprodutor, dadas as consequentes falhas de amostragem. A desova mostra-se assim síncrone, com a grande maioria das fêmeas amostradas durante o período de desova (abril a junho) em postura (Figura 14) embora os machos tenham apresentado uma especificidade diversa com representatividade também no mês de julho de 2012 e em janeiro de 2013 (Figura 15). A análise dos estádios de desenvolvimento das gónadas de fêmeas e machos, ao longo dos anos em que foram efetuadas amostragens, está apresentada nas figuras 14 e 15, respetivamente.

A análise microscópica das gónadas veio confirmar os estados de maturação atribuídos macroscopicamente e verificar que apenas 4,9% apresentaram evidência de hermafroditismo rudimentar, que se pode descrever como a presença de algumas, muito poucas, células sexuais femininas no seio da gónada masculina, quase sempre em fase de postura. Tais ocorrências não tiveram expressão nas observações realizadas, podendo ser tidas em conta como anomalias no desenvolvimento.

Durante os três meses do período de desova foram amostradas 194 fêmeas, das quais 52 foram usadas para investigar o tipo de fecundidade. As secções histológicas de fêmeas em desova apresentavam várias coortes de oócitos em diferentes estádios de desenvolvimento, assim como folículos pos-ovulatórios (pof) (Figura 16).

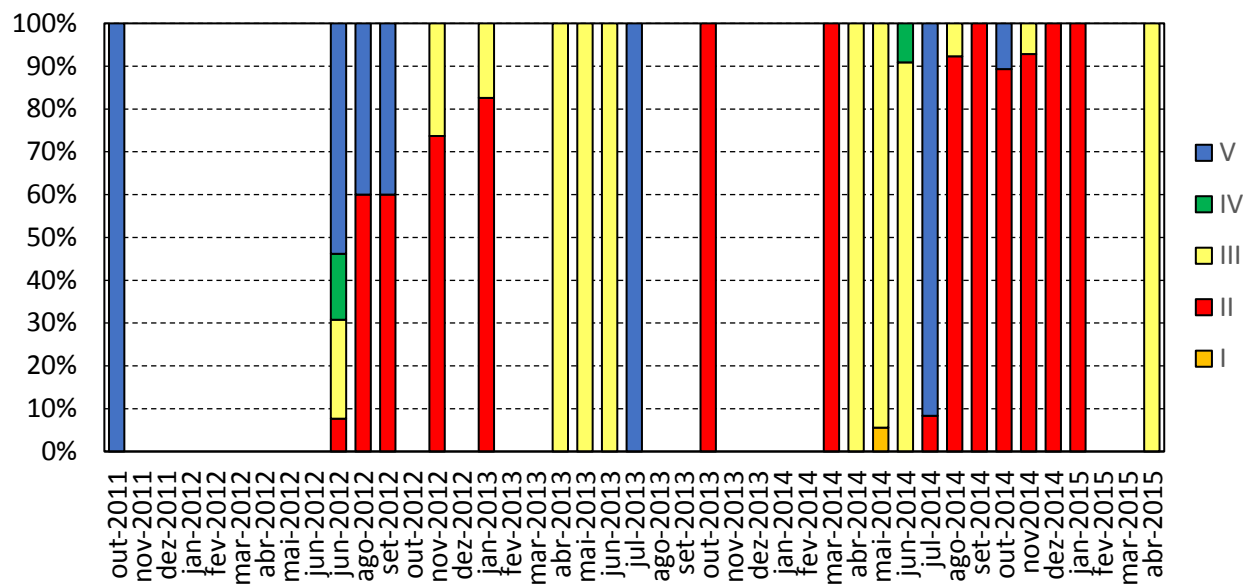


Figura 14. Distribuição sazonal dos estádios maturação de fêmeas de *Diplodus bellottii*, na região centro de Portugal.

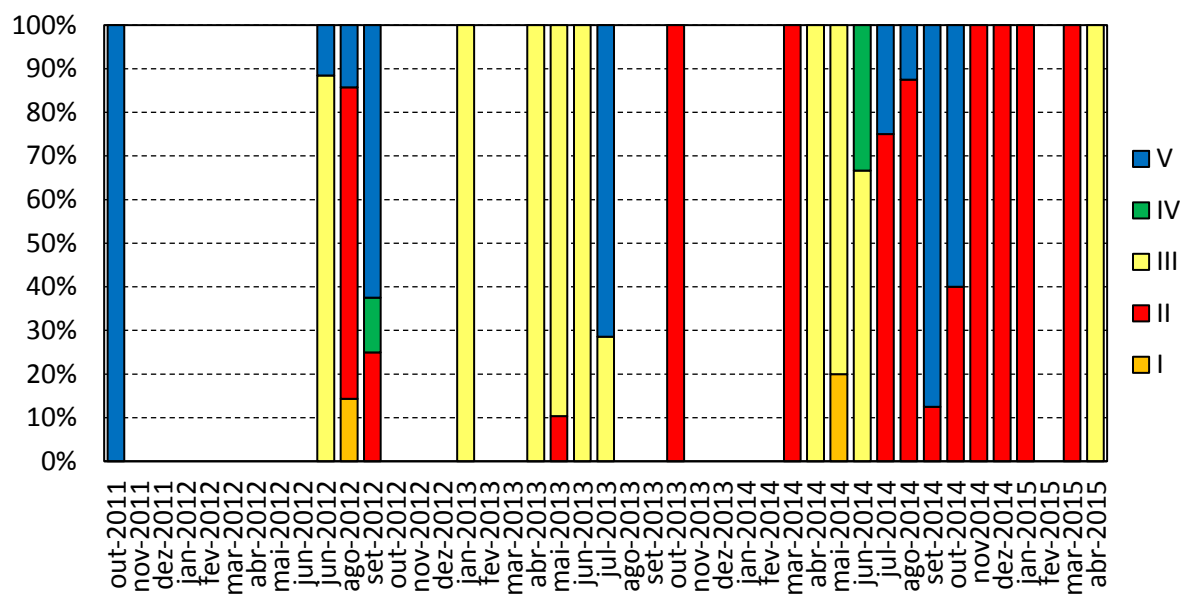


Figura 15. Distribuição sazonal dos estádios maturação de machos de *Diplodus bellottii*, na região centro de Portugal.

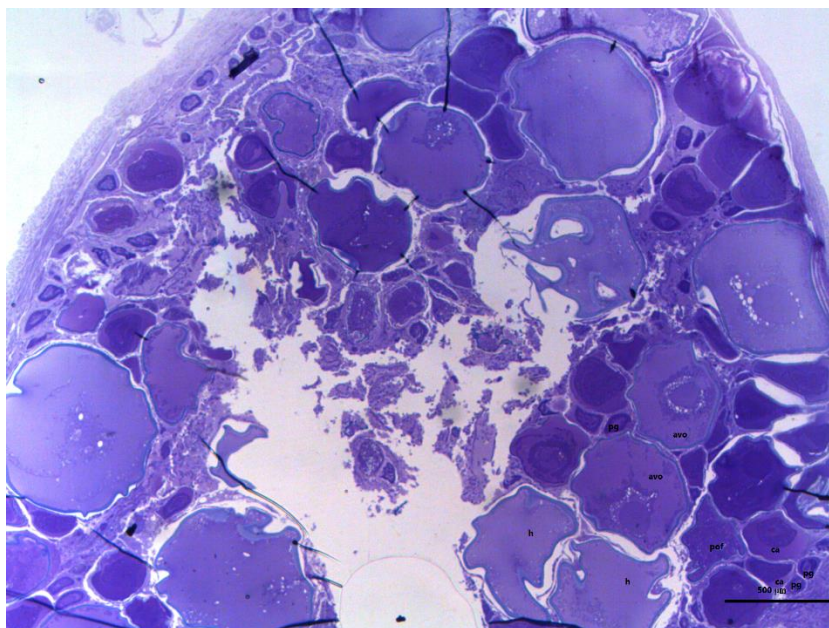


Figura 16. Secção histológica de ovário de fêmea de Sargo-do-Senegal, em desova, mostrando diversos lotes de oócitos em diferentes estádios de desenvolvimento. Oócito vitelogénico avançado, avo; alvéolo cortical, ca; folículo pos-ovulatório, pof; oócito hidratado, h.

O ciclo sexual de *D. bellottii* para ambos os sexos é síncrono. A análise da evolução mensal do IGS (Figura 17) vem corroborar a análise macroscópica dos estados de maturação, evidenciando que *D. bellottii* apresenta um único pico anual de desova, na primavera, com valores médios de IGS mais elevados nos meses de abril (6,342; 10,334, para machos e fêmeas, respetivamente), maio (5,086; 7,215, para machos e fêmeas, respetivamente) e junho (11,29; 10,34, para machos e fêmeas, respetivamente). De julho a março, os valores de IGS são claramente mais baixos, apresentando sincronia do padrão de variação temporal para fêmeas e machos (Figura 17).

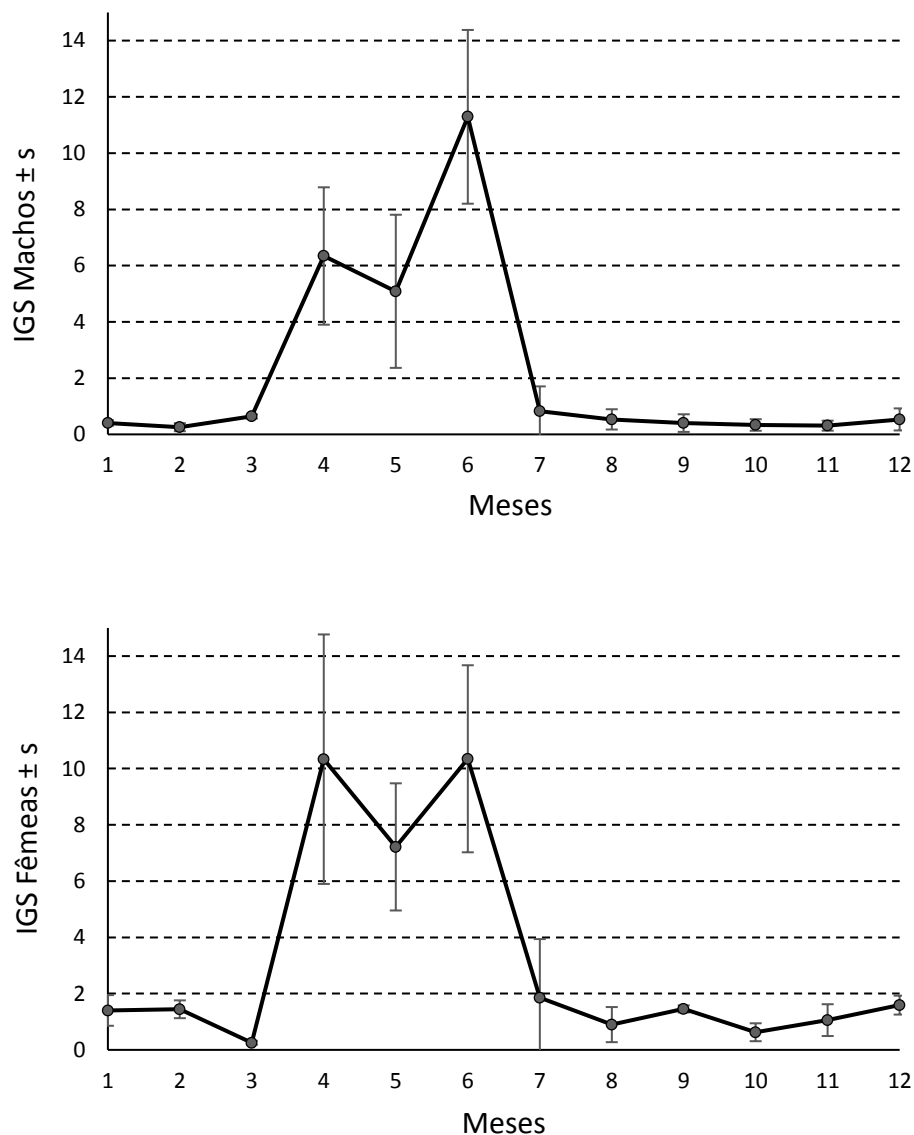


Figura 17. Representação gráfica do Índice Gonadosomático (IGS) médio, por mês, \pm desvio-padrão, dos machos e fêmeas em *Diplodus bellottii*, na região centro de Portugal Continental.

A figura 18 apresenta os valores médios do índice hepatossomático por mês, tornando-se mais relevante a flutuação nas fêmeas e em que se verifica um aumento gradual desde março a junho, só posteriormente se iniciando o decréscimo. O IHS médio por mês apresenta valores que variam entre 0.84% a 1.2% ($1.03\% \pm 0.4$) para machos e entre 0.76% a 2.19% ($1.29\% \pm 0.36$) para fêmeas. Os valores máximos foram observados no mês de outubro para os machos (1,273) e junho para as fêmeas (2,192); já os mínimos,

ocorrem em dezembro nos machos (0,844) e nas fêmeas em março (0,762) e dezembro (0,802).

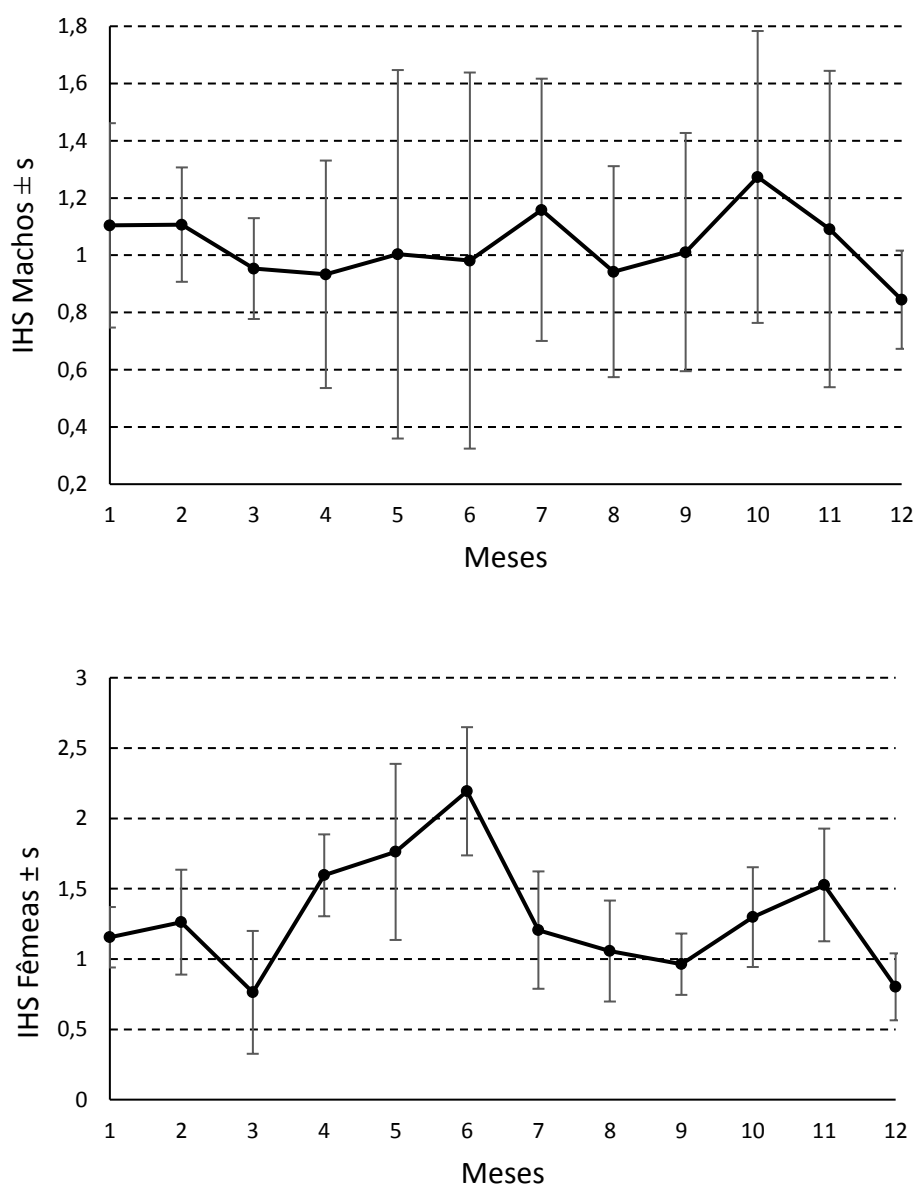


Figura 18. Representação gráfica do Índice Hepatosomático (IHS) médio, por mês, \pm desvio-padrão, dos machos e fêmeas em *Diplodus bellottii*, na região centro de Portugal Continental.

Relativamente a K, a média dos valores por mês varia entre 1.43% e 1.65% ($1.54\% \pm 0.12$) para machos e entre 1.46% e 1.66% ($1.58\% \pm 0.11$) para fêmeas (Figura 19). Os valores máximos verificam-se em setembro (1,656) nos machos e em abril (1,724) nas fêmeas; já os valores mínimos são encontrados nos meses agosto (1,439) e novembro (1,435) nos machos e em agosto (1,467) nas fêmeas.

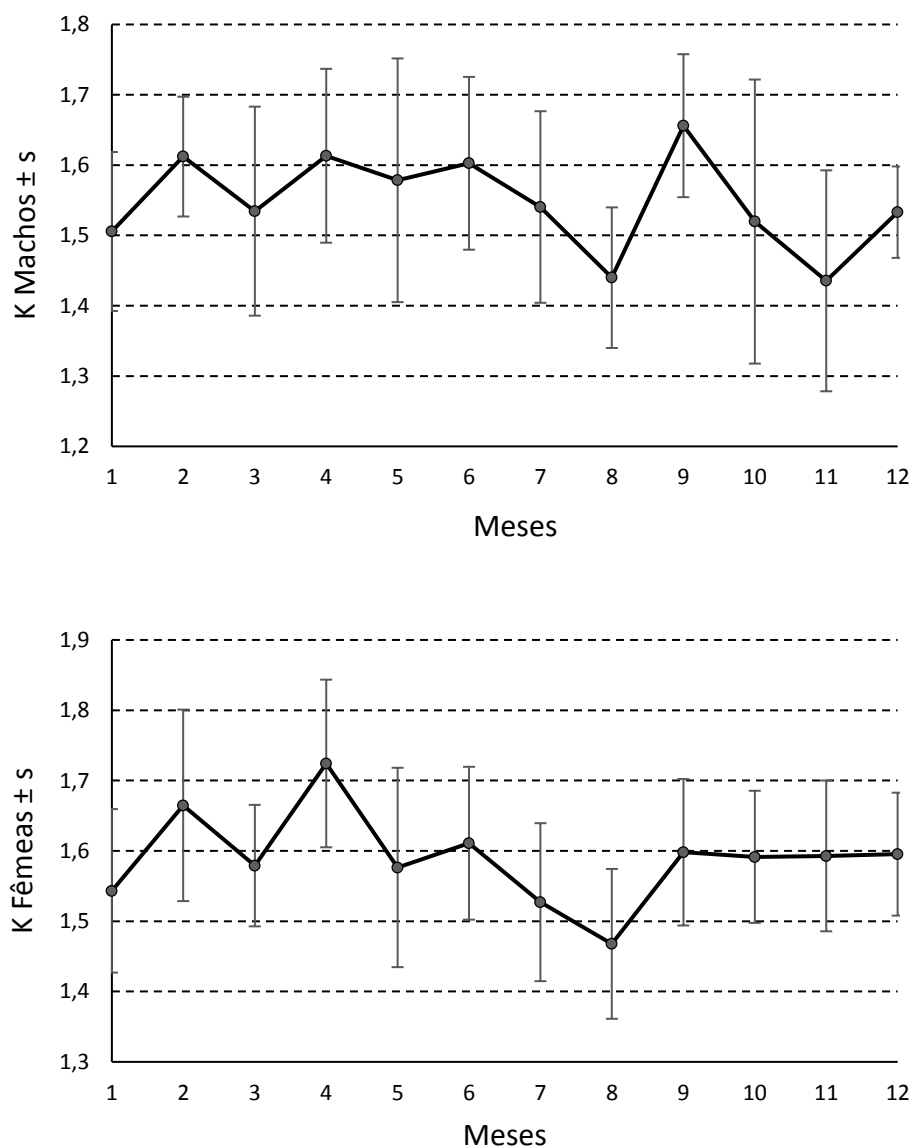


Figura 19. Representação gráfica do Factor de Condição (K) médio, por mês, \pm desvio-padrão, dos machos e fêmeas em *Diplodus bellottii*, na região centro de Portugal Continental.

Considerando a análise destes índices ao longo do ano, todos os índices apresentam diferença significativa entre meses, para ambos os sexos: para o IGS a diferença é significativa entre meses, para ambos os sexos (Teste Kruskal-Wallis, $p=0.000$: machos $H(11, n=296) = 229.26$; fêmeas $H(11, n=369) = 274.78$); assim como para o IHS (Teste Kruskal-Wallis, $p=0.002$: machos $H(11, n=296) = 42.21$; fêmeas $H(11, n=369) = 148.3$); e ainda para o K (Teste Kruskal-Wallis, $p=0.0229$: machos $H(11, n=296) = 31.65$; fêmeas $H(11, n=369) = 94.97$).

A média do IGS verifica a igualdade entre sexos, ou seja, a diferença entre sexos não é significativa (Teste Mann-Whitney, $Z= 1.8$; $p=0.07$), assim como o K mostra ser igual entre os sexos (Teste Mann-Whitney, $Z= 0.728$; $p=0.4$). Apenas o IHS apresenta diferença entre os sexos (Teste Mann-Whitney, $Z=10.65$; $p < 0.0001$).

A aplicação do modelo logístico à proporção de indivíduos maduros por cada classe de comprimento (intervalo de 1cm), por sexo, durante os meses de reprodução, resultou nas seguintes expressões:

$$\text{para machos, } Y = \frac{1}{1+e^{(-1((-494,394)+(52,0204)*Lt))}}$$

$$\text{e para fêmeas, } Y = \frac{1}{1+e^{(-1((-439,979)+(51,7558)*Lt))}}$$

Dos indivíduos amostrados, a fêmea madura mais pequena media 8,7cm e o macho maduro, 10,6cm. A figura 20 representa a ogiva de maturação para os machos e fêmeas, separadamente. Os comprimentos à primeira maturação (L_{50}) obtidos foram de 9,50cm e de 8,50cm, para machos e fêmeas, respetivamente. Tal corresponde a idades à primeira maturação de 2 e 1 anos, para machos e fêmeas, respetivamente.

O rácio sexual observado, de machos relativamente às fêmeas, é 0,8:1 (M:F), que estatisticamente ficou comprovado ser significativo ($\chi^2 = 8,0135$; $df = 1$; $p = 0.0046$) e diferente do esperado 1:1. Pela análise mensal do rácio sexual, e como resultado da aplicação do teste Qui-quadrado, foram encontrados valores diferentes de 1:1 nos seguintes meses: de 2:1 nos meses julho 2012 e junho 2013; em janeiro e julho 2013, obtiveram-se valores de 0,4:1 e 0,26:1, respetivamente; em maio, julho e outubro de 2014, valores de 0,2:1, 0,33:1 e 0,17:1, respetivamente. Os restantes meses analisados apresentam um rácio sexual de 1:1, o que, no entanto, prova que o conjunto das observações apresenta um rácio sexual 0,8:1 para esta espécie, na região centro de Portugal Continental.

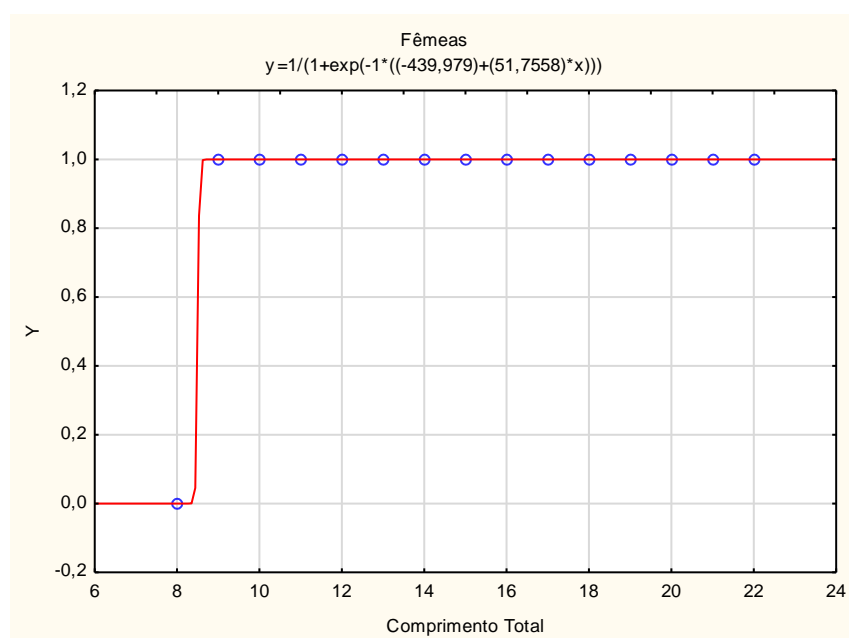
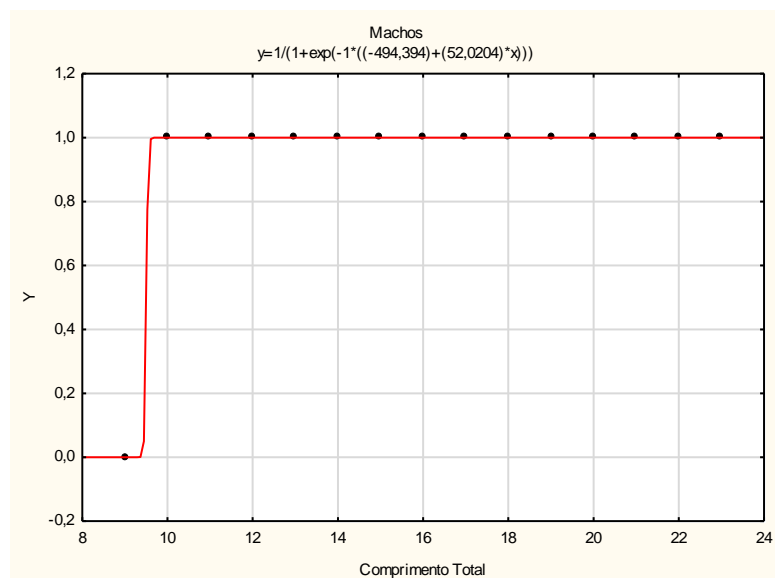


Figura 20. Representação gráfica da maturação de machos e fêmeas de *Diplodus bellottii*, na região centro de Portugal.

A distribuição de frequências do tamanho oocitário dos Sargos-do-Senegal é contínua não mostrando um hiato entre os oócitos pré-vitelogénicos e os oócitos vitelogénicos (Figura 21). De igual forma, também não existe uma coorte bem marcada que se desloca para a direita ao longo do período de desova. Os oócitos vitelogénicos avançados medem entre os 300 e 600 μm , sendo que os maiores representam uma

pequena fracção (inferior a 2%). Tal indica que os oócitos hidratados se desenvolvem a partir do stock permanente de oócitos vitelados.

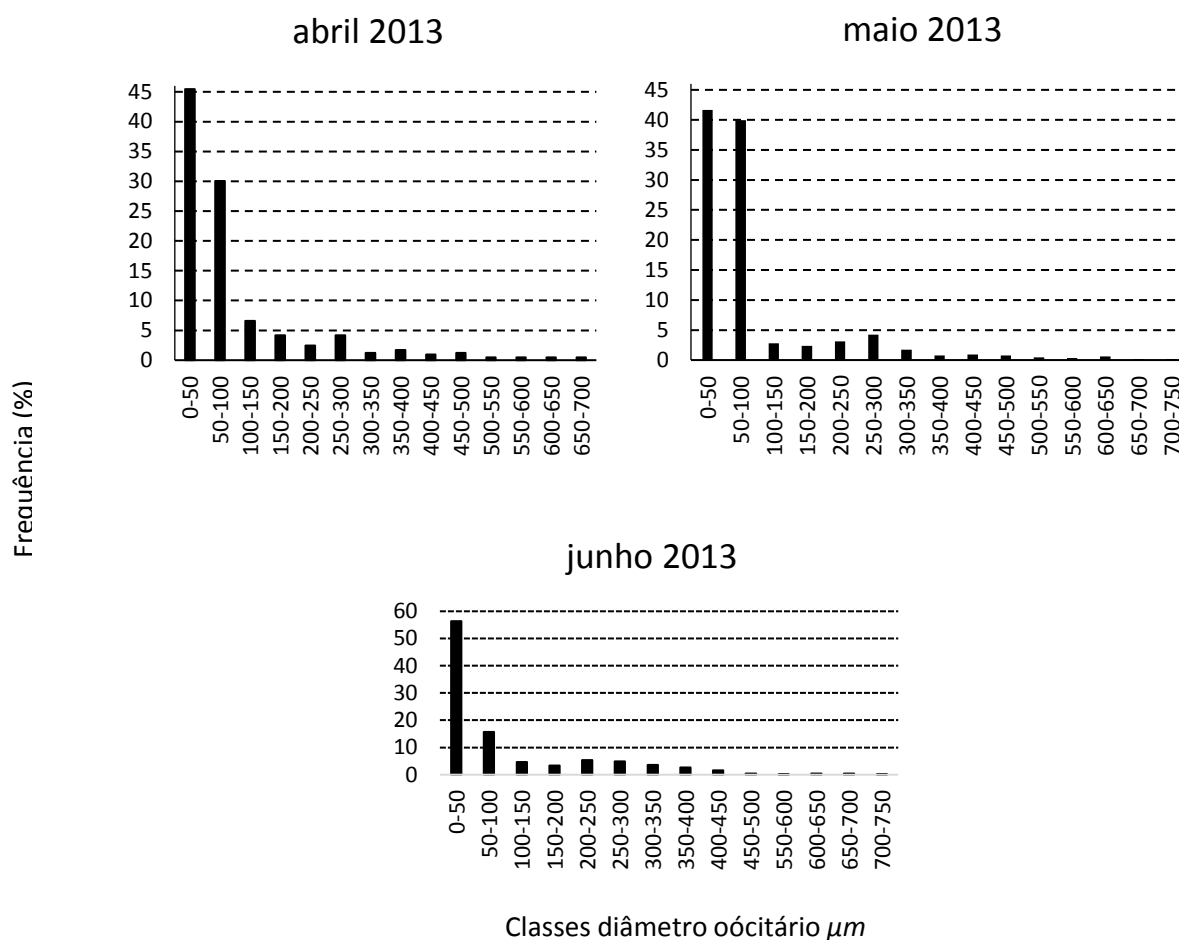


Figura 21. Distribuição de frequências do tamanho oocitário de *D. bellottii* (% de abundância por classes diâmetro 50 µm) durante o período de desova.

A figura 22 mostra o número médio de oócitos alvéolos corticais e oócitos vitelogénicos por grama de fêmea eviscerada presente ao longo da época de desova. A tendência é constante, embora os valores mais elevados no mês de abril para ambos os tipos celulares. Com efeito o teste de Kruskal-Wallis não evidencia diferenças significativas (Kruskal-Wallis: $\chi^2 = 5.6$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0.0608$ para os oócitos alvéolos corticais; $\chi^2 = 3.822$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0.147$ para os oócitos vitelados).

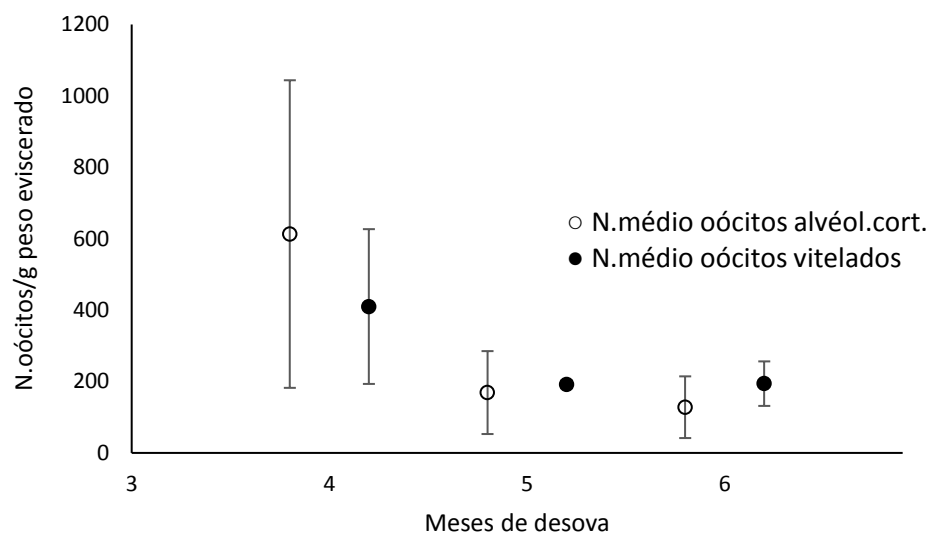


Figura 22. Número de oócitos alvéolos corticais e de oócitos vitelogénicos de Sargo-do Senegal, por grama de fêmea eviscerada, \pm desvio-padrão, durante a época de desova.

O diâmetro médio dos oócitos vitelogénicos avançados mostra uma tendência crescente ao longo da época de desova (Figura 23), tendo sido encontradas diferenças significativa entre estes valores (ANOVA: $F = 3.608$, $d.f = 2$, $p = 0.0347$).

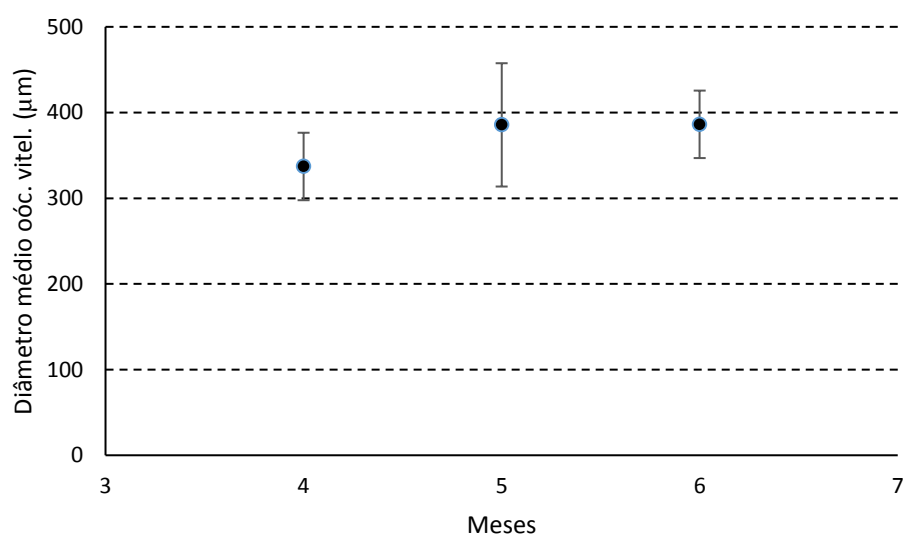


Figura 23. Diâmetro médio dos oócitos vitelogénicos avançados, valor médio por mês \pm desvio-padrão, de *Diplodus bellottii* ao longo da época de postura.

No que respeita à intensidade relativa da alfa atresia, embora sempre presente ao longo da época de desova, não foi possível a sua contabilização efetiva dada a muito frequente incidência de massas atréticas (Paiva et al., 2014) nos ovários dos indivíduos amostrados, inviabilizando a correta identificação deste tipo de células.

3.4 Discussão

A reprodução é a fase mais crítica do ciclo de vida duma espécie, já que determina a sua sobrevivência. O Sargo-do-Senegal é uma espécie dióica, ao contrário de outras espécies do género *Diplodus* que apresentam hermafroditismo, como *D. vulgaris* (Gonçalves et al., 2003), *D. annularis* (Pajuelo e Lorenzo, 2002b), *D. sargus* (Pajuelo e Lorenzo, 2004), *D. cervinus* (Pajuelo et al., 2003b). No entanto, outros estudos apontam para a ocorrência de hermafroditismo rudimentar em espécies como *D. vulgaris* (Gonçalves e Erzini, 2000; Pajuelo et al., 2006), *D. sargus* (Mouine et al., 2007), *D. puntazzo* (Pajuelo et al., 2008), *D. annularis* (Alós et al., 2010).

A literatura sobre reprodução em sparídeos aponta para a sazonalidade da desova relacionada com a disponibilidade alimentar e a temperatura da água do mar (Pajuelo e Lorenzo, 2001; Pajuelo et al., 2003b, 2006), podendo-se atribuir a ocorrência deste evento a um intervalo de temperatura entre os 15°-20°C (Dujakovic e Glammuzina, 1988). É ainda afirmado que nestas espécies, se por um lado, a época de postura surge programada de forma a assegurar que o novo recrutamento de juvenis nas águas costeiras coincida com o ciclo anual de produtividade, por outro, está sincronizado de forma a evitar o recrutamento de outras espécies de *Diplodus*. (Biagi et al., 1995; Harmelin-Vivien et al., 1995; Vigliola et al., 1998; Planes et al., 1999). É uma espécie com desovas múltiplas, mas cujo ovário apresenta desenvolvimento assíncrono, já que oócitos em todos os estádios de desenvolvimento estão presentes ao mesmo tempo sem dominância. Só quando a hidratação ocorre é que há um stock separado de oócitos, como se pode verificar pela distribuição de frequências do tamanho de oócitos.

Diplodus bellottii na região centro de Portugal Continental possui um período de desova definido, cujos dados deste estudo sugerem que ocorre entre os meses de primavera, simultaneamente nos machos e fêmeas. Espécies como *D. cervinus* e *D. annularis*, nas Ilhas Canárias, possuem épocas de reprodução coincidentes, março a

julho, com pico em maio-junho e março-abril, respetivamente (Pajuelo e Lorenzo, 2001; Pajuelo et al., 2003b).

O IGS mostra um só pico nos valores para estes meses do ano. Algumas extensões ao período de desova podem indicar condições ambientais favoráveis à desova e desenvolvimento das larvas por um período mais alargado. O IGS é geralmente indicativo do sucesso reprodutivo (refletindo também a qualidade da água e qualidade do ambiente em geral). Os valores de K, do IHS e IGS são não só sensíveis à poluição ambiental, mas podem ser afetados por fatores como temperatura e disponibilidade alimentar. No que respeita às fêmeas, o IHS reflete uma sincronicidade com o IGS para o período de abril a junho, apresentando nesses meses os valores mais elevados, seguindo-se um gradual decréscimo. Tal não se verifica nos machos, em cujo valor médio do IHS se apresenta muito constante ao longo do ano. O fator de condição, nesse período reprodutivo, sofre uma tendência decrescente (mais notória nas fêmeas), atingindo o mínimo no mês de agosto nas fêmeas, que se explica pela exaustão de reservas neste período reprodutor. No entanto, nos machos, os mínimos do fator de condição verificam-se em agosto e em novembro, colmatando com o atingir da sua mínima condição física que se denota nestes meses. Refletindo o valor do fator de condição a condição nutricional recente e consequentes gastos das reservas, como é o exemplo da desova, este parâmetro atinge o seu máximo imediatamente antes do início da desova, como se verifica nas fêmeas. Nos machos tal não se verifica exatamente, podendo estar relacionado com outros fatores que intervêm de igual forma. No outono, os máximos do IHS ocorrem provavelmente devido à maior intensidade alimentar e consequente acumulação de reservas lipídicas, podendo sofrer alterações tanto em função dos fatores intrínsecos (reservas orgânicas, desenvolvimento gonadal e tamanho dos exemplares), quanto dos fatores extrínsecos, como temperatura, fotoperíodo e disponibilidade alimentar. No entanto, os valores de IHS e K são concordantes e coincidentes, ocorrendo os máximos em outubro e setembro, respetivamente. A estes valores corresponde provavelmente a acumulação de reservas energéticas para o período de inverno.

Sendo o índice gonadosomático a relação do tamanho da gónada com o tamanho do peixe, é pois, um bom indicador do seu desenvolvimento sexual (Dadzie e Wangila, 1980). É deste índice que se determina a percentagem do peso corporal do peixe que é usado para a produção de ovos e revela, muitas vezes, diferenças entre espécies ou mesmo dentro da espécie, consoante a sua distribuição geográfica. O conhecimento do tipo de

fecundidade de um peixe é também de extrema importância no que se refere à biologia das pescas já que é usado para estimar o potencial reprodutivo (Murua e SaboridoRey, 2003), assim como a biomassa do stock desovante quando se usam métodos de produção de ovos (Armstrong e Witthames, 2012; Stratoudakis et al., 2006). Determinar incorretamente o tipo de fecundidade pode levar ao erro na estimativa da fecundidade de uma ordem de grandeza demasiado importante (Hyle et al., 2014).

Relativamente ao rácio-sexual, durante o período amostrado, apenas houve uma pequena representatividade da predominância de machos em relação às fêmeas em dois períodos isolados; nos restantes, há maioritariamente uma dominância das fêmeas ou ainda uma comprovada igualdade entre os sexos. Daqui surge a constatação de que, pelo que foi amostrado, em média, se mostra uma dominância das fêmeas em relação aos machos na razão de 0,8:1; e que estes valores não refletem uma nítida correlação com o mês do ano. O rácio-sexual fornece informação sobre a representatividade de cada um dos sexos na população amostrada, constituindo informação básica necessária para a avaliação do potencial reprodutivo da espécie e a estimação do tamanho dessa população (Vicentini e Araujo, 2003), uma vez que pode ser incluído na determinação da biomassa desovante de fêmeas.

Um critério principal para julgar o estado duma população de peixes é o tamanho da fração reprodutora ou stock desovante (Jakobsen et al., 2009). A biomassa do stock desovante (SSB) das populações da maioria dos peixes explorados é normalmente avaliado analiticamente numa base anual sendo usada a ogiva de maturação. A idade à 1ª maturação determinada de 2 anos para machos e 1 ano para fêmeas pode eventualmente estar sobreestimada, devido à insuficiente representatividade de exemplares das classes mais jovens. No entanto, estes valores são concordantes com o que tem sido encontrado para outras espécies do género *Diplodus*: uns apontam 2 anos para *D. vulgaris* (Gonçalves e Erzini, 2000; Pajuelo et al., 2006), ou apresentam a sua ocorrência a partir de 1 ano de idade, em *D. annularis* (Pajuelo e Lorenzo, 2002b), ou até 1 ano para os machos e 2 para as fêmeas (Pajuelo e Lorenzo, 2001).

No geral, numa população, o tamanho dos ovos libertados não varia muito, sendo independente do tamanho do peixe e sua idade. Há, no entanto, uma relação entre o tamanho dos ovos e as condições ambientais: evidências mostram uma correlação negativa entre a condição da fêmea progenitora e o tamanho do ovo, *i.e.*, peixes com melhor condição produzem mais ovos, mas mais pequenos (Miller e Kendall Jr., 2009).

Comparações entre espécies e populações também demonstram que o tamanho dos ovos (e os recém-recrutas) estão negativamente correlacionados com a fecundidade. Ovos maiores, com mais reservas, que é uma extensão de estratégia de proteção ao nascimento já que a larva possui maior quantidade de reservas, identificam, no entanto, uma menor fecundidade. Pode então dizer-se que a produção de ovos maiores, com grande quantidade de reservas nutritivas e um maior tamanho das larvas à nascença, é uma espécie de extensão de cuidados maternos para a descendência, enquanto um maior número de pequenos ovos pode ser considerado uma medida de proteção que assegura a sobrevivência da espécie contra a mortalidade massiva de ovos e larvas, particularmente por predação. Este argumento foi, por exemplo, usado para interpretar as diferenças na fecundidade entre as várias populações de arenque (*Clupea harengus* L.) no Mar do Norte, que desovam em diferentes estações do ano, como resultado das diferentes condições que as larvas encontram (Hempel, 1979). Assim, no inverno, os arenques desovam ovos de grandes dimensões, mas em pequeno número, enquanto no verão produzem ovos mais pequenos e em grande quantidade. Durante o inverno as larvas encontram menos predadores, mas por sua vez possuem menor disponibilidade de alimento do que os recrutas no verão. Estes conceitos necessitam obviamente de ser testados caso a caso, e cada vez mais a fundo.

Para se designar o tipo de fecundidade do Sargo-do-Senegal, as 4 linhas de evidência sugeridas por Hunter et al. (1992), Greer Walker et al. (1994) e Murua e Saborido-Rey (2003) foram investigadas. A ausência de hiato está normalmente relacionada com a fecundidade indeterminada embora haja espécies com fecundidade determinada (sarda e linguado, por exemplo) que também o apresentam. O número de oócitos em estado avançado de desenvolvimento não diminui ao longo do período de desova, característico da fecundidade do tipo indeterminado. O diâmetro médio dos oócitos vitelogénicos ao longo da época de postura aumenta durante a época de desova o que é característico das espécies com fecundidade determinada. Relativamente à ocorrência de atresia não se chegou a uma conclusão uma vez que apenas foi contabilizada a incidência de massas atréticas (Paiva et al., 2014) nos ovários dos indivíduos amostrados, inviabilizando uma contagem efetiva. Assim, serão necessários mais estudos para concluir sobre o tipo de estratégia em termos de fecundidade embora, com os dados disponíveis, a fecundidade do tipo indeterminado tenha uma forte possibilidade de vir a ocorrer.

PARTE 2

PARTE 2

Estrutura de stocks

CAPÍTULO 4

PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

4.1 Introdução

O conceito de stock, em pescas, tem sido tradicionalmente definido de diferentes formas, sendo a definição genética e a operacional as mais usadas. A definição genética diz que um stock é uma unidade reprodutivamente isolada e diferente dos outros stocks (Carvalho e Hauser, 1994), enquanto a operacional, proposta por Begg e Waldman (1999), afirma que um stock é um grupo semi-discreto de peixes, com definidos atributos com interesse para os gestores. Numa população com diferenças genéticas não detectáveis, pode ser possível ter unidades discretas separadas (stocks), cada um com as suas características de história de vida (crescimento, mortalidade, reprodução) e mostrando uma resposta diferente à exploração pesqueira (Gauldie, 1988; Begg e Waldman, 1999). Torna-se então importante identificar estas unidades populacionais e a sua distribuição, as suas migrações, as áreas de desova e o grau de sobreposição espacial e temporal com outros stocks.

A fiabilidade da avaliação de stocks, assim como a eficácia da gestão das pescas, é severamente limitante para os principais recursos pesqueiros porque a sua estrutura populacional e a sua delimitação são incertas (Waldman, 2007). Diferentes métodos são frequentemente empregues para a identificação de populações duma espécie de peixe. Recentemente, a análise da morfometria do corpo dos peixes e caracteres merísticos (Taylor e McPhail, 1985; Melvin et al., 1992; Hurlbut e Clay, 1998; Turan, 2004), que consiste no estudo da variação da forma e sua covariância com outras variáveis (Bookstein, 1991; Dryden e Mardia, 1998), e a análise da morfologia do contorno dos otólitos, que aplica transformações de Fourier às coordenadas Cartesianas dos contornos ou recorre à análise elíptica de Fourier, têm mostrado ser ferramentas promissoras na identificação de populações (Campana e Casselman, 1993; Begg e Brown, 2000; Tuset et al., 2003).

Há cerca de 25 anos, Rohlf e Marcus (1993) propuseram novos métodos que revolucionaram a abordagem da morfometria. Ainda nos anos 80, uma análise alternativa foi proposta e desenvolvida, representando já uma mudança radical na forma como estruturas anatómicas são quantificadas e analisadas (Boas, 1905; Galton, 1907; Sneath,

1967) e que consistia na captação da geometria das estruturas morfológicas de interesse e sua consideração nas análises. Chamou-se então morfometria geométrica (Corti, 1993). Mas esta “revolução”, como foi chamada, que converteu a morfometria tradicional na morfometria geométrica, contemplou a mudança quer na metodologia, quer nas marcas conceituais e estatísticas deste campo. São assim usadas coordenadas de “landmarks”, curvas de contornos e superfícies como dados quantificadores da forma (Adam et al., 2013), que se revela uma poderosa técnica para o estudo da variação da forma e identificação das suas causas.

A morfometria geométrica é, pois, a análise estatística da variação das formas e a sua covariância com outras variáveis (Bookstein, 1991), cujos métodos utilizam coordenadas cartesianas de “landmarks” anatómicas para quantificar a variação na forma anatómica de objetos, após os efeitos da variação não associada à forma terem sido matematicamente mantidos constante. Estes estudos são realizados através do Paradigma Procrustes, uma abordagem à análise da forma que surge da unificação da rigorosa estatística da teoria da forma (Kendal, 1981, 1984, 1985) com procedimentos analíticos que sobrepõem as configurações dos “landmarks”, obtendo assim as variações na forma (Gower, 1975; Bookstein, 1986; Rohlf e Slice, 1990; Rohlf, 1999b).

Passada a última década, verifica-se uma fase de maturação da morfometria geométrica, com o rápido desenvolvimento do uso de dados tri-dimensionais, sendo para a sua aquisição necessário equipamento especializado, extremamente dispendioso, estando limitado à análise de uma restrita gama de tamanho. Apesar dum certo número de opções mais acessíveis ter aparecido então, como *scanners* de superfície entre outros, a restrição à bidimensionalidade dos dados mostra-se mais prática

A morfometria geométrica, que inclui métodos de delineação do contorno do peixe, por marcação de *landmarks* (Adams et al., 2004), é uma ferramenta descritiva que fornece com grande detalhe e precisão as alterações e as variações na forma do corpo, baseado em marcações anatómicas homólogas (Strauss e Bookstein, 1982), com base na análise estatística multivariada.

Por outro lado, se até aqui a análise mais simples do contorno do otólito se baseava na comparação das distâncias lineares entre as formas dos otólitos, procedimentos mais recentes usam métodos de esboço geométrico para quantificar as formas do contorno dos otólitos, de modo que os padrões de variação da forma dentro dum grupo e entre os grupos

sejam avaliados (Cadrin e Friedland, 1999; Cadrin et al., 2005). Atualmente o método mais comum envolve a análise de Fourier (Campana e Casselman, 1993) e análise elíptica de séries de Fourier para descrever a forma do contorno dos otólitos (Kuhl e Giardina, 1982; Stransky et al., 2008a, b). Caso esta discriminação seja estatisticamente significativa, a análise do contorno da forma do otólito torna-se uma ferramenta de monitorização vantajosa na deteção do nível de mistura de grupos nas áreas de exploração pesqueira, dado o seu baixo custo e procedimentos simples.

4.2 Material e métodos

Com o objetivo de identificar a estrutura populacional do Sargo-do-Senegal no Sul do Nordeste Atlântico, foram amostrados 3 locais, dentro da área de distribuição da espécie: Cádiz, Algarve e Região Centro de Portugal. As amostras foram obtidas por pesca artesanal dirigida, usando o anzol ou redes de arrasto e de emalhar, desde fevereiro 2013 a outubro 2014 (Figura 24). Apenas foram considerados os indivíduos sexualmente maduros ($L_t > 11\text{cm}$). Os peixes foram congelados, e descongelados no momento precedente à análise morfológica. O comprimento total (L_t , aprox. 0,1cm) e o sexo de cada indivíduo foram registados. Para restringir a análise aos indivíduos sexualmente maduros, assim como minimizar a variabilidade resultante pelo efeito tamanho, foram considerados peixes apenas dentro da gama de tamanho 11-22cm L_t nas 3 áreas, num total de 266 indivíduos: 70 indivíduos de Cádiz (L_t 11,3 a 21,7cm; 36 fêmeas e 34 machos), 72 do Algarve (L_t 13,2 a 19,4cm; 41 fêmeas e 31 machos) e 124 da Região Centro (Sado) (L_t 13,2 a 20,3cm; 88 fêmeas e 36 machos). No entanto, os dados morfométricos foram estatisticamente ajustados para permitir análise comparativa da forma, independentemente do tamanho (Thorpe, 1983).



Figura 24. Mapa da localização das áreas amostradas. S- Região Centro-Sado; A- Algarve; C- Cádiz.

a) Morfometria do corpo

Foram escolhidos pontos marcantes no corpo do indivíduo, os *landmarks* (LM), de acordo com critérios já existentes para espécies próximas (Loy et al., 1998; Sarà et al., 1999; Loy et al., 2000). Os *landmarks* foram marcados em cada indivíduo com o auxílio de alfinetes de entomologia e os exemplares foram posteriormente fotografados usando uma câmara digital Canon EOS 350D com foco fixo na lente 50mm, para evitar distorção da imagem.

Foram escolhidos os seguintes *landmarks*, correspondendo essencialmente a estruturas duras (i.e. pontos de inserção de barbatanas) distribuídas ao longo do contorno do corpo do peixe (Cadrin, 2000): (1) Parte anterior do focinho; (2) centro do olho; (3) Ponto posterior do crânio neuronal; (4) Origem da parte espinhosa da barbatana dorsal; (5) Origem da parte mole da barbatana dorsal; (6) Raio mole médio da barbatana dorsal; (7) Final da barbatana dorsal; (8) Pedúnculo caudal região dorsal; (9) Origem dorsal da barbatana caudal; (10) Ponto de intersecção da linha lateral com a barbatana caudal; (11) Origem ventral da barbatana caudal; (12) Pedúnculo caudal região ventral; (13) Final da barbatana anal; (14) Inserção da barbatana anal; (15) Inserção da barbatana pélvica; (16) Inserção do opérculo vista perfil lateral; (17) Inserção da barbatana peitoral (Figura 25).

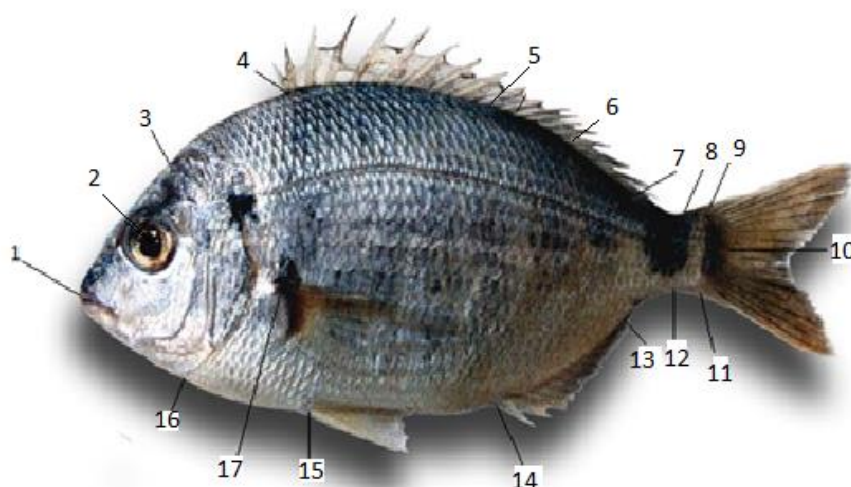


Figura 25. *Landmarks* usadas na análise morfometria geométrica dos indivíduos de *D. bellottii*.

Todo o processo de captação de imagem e posterior processamento foi efetuado com o auxílio do *software* TPS. Cada marca anatômica foi transformada em coordenadas cartesianas através do *software* TpsDig versão 2.10 (Rohlf, 2006).

Os dados morfométricos foram estatisticamente ajustados como forma a permitir a análise comparativa em termos da forma independentemente do tamanho (Thorpe, 1983). Para retirar a variação não relacionada com a forma, as configurações das marcas anatômicas foram submetidas a análise generalizada por sobreposição da técnica de Procrustes às coordenadas cartesianas das marcas anatômicas (Rohlf, 1990) e calculadas as distâncias entre pares dessas mesmas marcas. Desta forma as configurações foram centradas, sujeitas a uma escala e rotação, minimizando as distâncias dos mínimos quadrados (distâncias de Procrustes) entre marcas homólogas dos indivíduos. A distância de Procrustes, a medida padrão para a magnitude das diferenças na forma usadas em morfometria geométrica (*i.e.* Bookstein, 1996), é uma medida absoluta do grau de diferença na forma entre duas configurações, não dependendo de fatores como variação intra-amostra. Dada a composição de tamanhos da amostra (diferentes tamanhos dos indivíduos e diferente número de indivíduos de cada classe de tamanho), foi efetuada uma

correção alométrica por regressão multivariada das coordenadas de Procrustes no tamanho do centróide (Monteiro, 1999), para estimar e remover o efeito do tamanho na forma (alometria). Foi expressa em percentagem da variação total à quantidade de variação da forma dos indivíduos relativamente à média da amostra e foi realizado um teste de permutação usando 10000 repetições (Good, 1994). Seguidamente, os resíduos desta regressão foram usados em subseqüentes análises estatísticas como variáveis independentes do tamanho.

Numa primeira fase, foi quantificada a diferença entre a forma média de machos e fêmeas usando a distância Procrustes, para determinar a existência de dimorfismo sexual nas áreas estudadas e testada a hipótese nula de que não existem diferenças entre machos e fêmeas.

Para detetar diferenças morfométricas na forma do corpo de *D. bellottii* das 3 áreas e influir se a forma do corpo pode ser usada para classificar amostras relativamente à área de origem, foi efetuada a análise de variância canónica (CVA). A comparação “pairwise” da forma média dos sargos do Senegal dos diferentes locais baseou-se na distância de Procrustes e teste de permutação com 10000 repetições para testar a hipótese nula de que não existe diferenças entre as amostras. Foi usada uma correção Bonferroni para testes múltiplos, com uma taxa-erro experimental de 0,05. Foram feitos desenhos de contorno usando uma função interpolação spline-placa fina (Bookstein, 1989) para visualizar a forma média destes peixes dos vários locais, através do software-package MorphoJ (Klingenberg, 2008).

Foi ainda realizada uma análise discriminante com as variáveis usando o SPSS 22.0 (SPSS Inc.) e o procedimento “jackknife” de validação-cruzada para calcular uma estimativa não enviesada do sucesso da classificação.

Neste procedimento, cada indivíduo foi alocado ao grupo cujo centróide estava mais perto (Ripley, 1996) e foi calculada a proporção de indivíduos corretamente alocados. A eficácia da análise discriminatória foi testada pelo Wilk’s Lambda (k) (Wilks, 1932) e Cohen’s Kappa (j) (Cohen, 1960) que, de acordo com Titus et al. (1984), fornece resultados mais fiáveis.

b) Morfologia do contorno do otólito

Os otólitos *sagitta* foram extraídos aos pares, limpos dos restos da *maccula*, secos e foram captadas imagens digitais para cada otólito direito com câmara de vídeo (Leica DFC290) ligada a uma lupa estereoscópica binocular Wild (ampliação 12X). Os otólitos foram colocados sobre superfície escura, posicionados com o rostro para o lado esquerdo e o *sulcus acusticus* para baixo, no momento da captação de imagem sob luz refletida.

Do total dos 266 indivíduos foram selecionados otólitos de 228: 70 otólitos de indivíduos de Cádiz (Lt 11,3 a 21,7cm; 36 fêmeas e 34 machos), 72 do Algarve (Lt 13,2 a 19,4cm; 41 fêmeas e 31 machos) e 86 da Região Centro (Sado) (Lt 15 a 19,4cm; 50 fêmeas e 36 machos).

Tendo em vista a caracterização das várias populações procedeu-se à análise de Fourier dos contornos obtidos das imagens de alto-contraste dos otólitos. A aproximação elíptica de Fourier, descrita por Kuhl e Giardina (1982), foi usada para facilitar a análise da forma a 2 dimensões (Lestrel, 1989), que consiste na decomposição da curva, do conjunto das elipses harmonicamente relacionadas. Cada harmónico contempla 4 coeficientes que são usados como variáveis de entrada para a análise multivariada padrão (Baylac e Frieß, 2005). O programa SHAPE 1.3 (Iwata e Ukai, 2002) foi usado para extrair os descritores elípticos de Fourier (EFDs) dos contornos da forma dos otólitos. O programa ChainCoder extrai o contorno do otólito da imagem digital e armazena a informação relevante como uma sequência de códigos. O Chc2Nef fornece os coeficientes EFDs normalizados (NEFDs) pela transformação discreta de Fourier da sequência de códigos do contorno, que causa a degeneração dos 3 primeiros coeficientes para valor fixo: $a_1=1$, $b_1=c_1=0$. Para cada otólito são gerados 100 harmónicos.

Apesar da exatidão da reconstituição da forma do otólito aumentar com o número de descritores usados é, no entanto, desejável diminuir o número de harmónicos para a análise multivariada. Assim, seleciona-se o número mínimo de harmónicos para a melhor reconstrução do contorno do otólito, sendo o nível de 99% de variância acumulada o adotado (Stransky *et al.*, 2008). A variância de cada harmónico é proporcional à sua amplitude e fornece a medida da influência de cada harmónico na forma do contorno (Lestrel, 1997). A variância do harmónico n é dado pela expressão:

$$S^2 = \frac{(a_n^2 + b_n^2 + c_n^2 + d_n^2)}{2}$$

Onde a_n , b_n , c_n e d_n são coeficientes do harmónico n . Assim, a variância acumulada é calculada como

$$S_c^2 = \sum_1^n S$$

Uma sub-amostra de 10 otólitos de cada sexo e de cada local foi escolhida ao acaso e usada na determinação o número adequado de harmónicos para a análise.

Métodos estatísticos

A análise de variância multivariada (MANOVA) foi usada para determinar o efeito da área e do sexo nos NEFDs. A análise discriminante canónica (CDA) foi aplicada para deteção de diferenças morfométricas nos otólitos do Sargo-do-Senegal das 3 áreas e investigar a capacidade de a forma dos otólitos poder ser usada para classificar amostras desta espécie relativamente ao local de origem. O método *stepwise* foi usado na escolha das variáveis a incluir nas funções discriminantes. Os procedimentos da validação cruzada *Jackknife* foram usados para o cálculo da estimativa não enviesada do sucesso da classificação.

As análises estatísticas foram realizadas no Statistica 12.0, à exceção do CDA no qual se usou o SPSS 22.0. Em todas as análises efetuadas, o nível de significância foi fixado em 0.05.

4.3 Resultados

a) Morfometria do corpo

A figura 26 apresenta os dados obtidos pela Análise Procrustes para as diferentes áreas consideradas, com correção alométrica para remover o efeito do tamanho na forma. Desta análise foi detetada uma pequena porção de variação da forma atribuída ao crescimento alométrico (4.251% de variação total da forma) e a relação entre forma e tamanho foi estatisticamente significativa ($p < 0.0001$).

Foi determinada a não existência de diferenças na forma entre indivíduos de ambos os sexos, nas 3 áreas sob estudo ($p_{\text{Algarve}}=0.171$; $p_{\text{Cádiz}}=0.468$; $p_{\text{Sado}}=0.115$), pelo que a variável sexo não é determinante na forma do corpo dos indivíduos, tendo os dados de fêmeas e machos sido agrupados para as restantes análises.

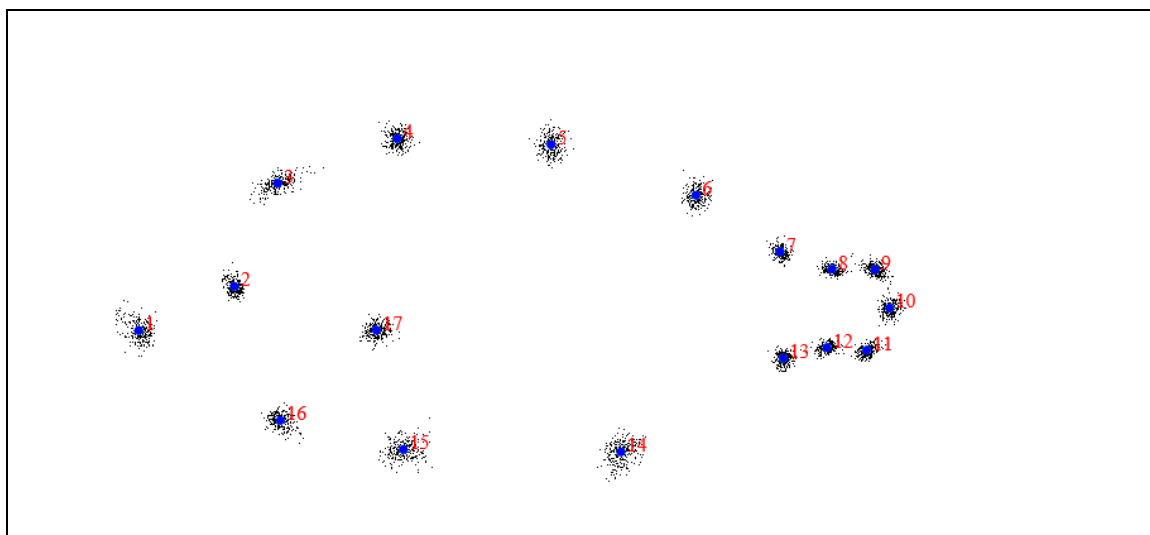


Figura 26. Análise Procrustes, correção alométrica.

Foram encontradas diferenças significativas na forma média do corpo dos indivíduos entre as 3 áreas geográficas (Tabela 5).

Tabela 5. Distâncias Procrustes entre forma média do corpo de *Diplodus bellottii* das 3 áreas em estudo e os correspondentes valores de p (entre parêntesis, nível de significância de 5%) obtidos por testes de permutação (10000 repetições).

Area	Algarve	Cádiz
Cádiz	0.0211 ($p < 0.001$)	-
Sado	0.0173 ($p < 0.001$)	0.0285 ($p < 0.001$)

Diferenças entre as configurações médias de *D. bellottii* obtidas para cada um dos 3 locais geográficos estão representados na figura 27, em que a forma média dos espécimes do Algarve se apresenta em cinza, os do Sado a azul e os de Cádiz a vermelho. Diferenças na forma são mais evidentes na região dorsal-ventral, que se traduz na maior altura do corpo que os indivíduos de Cádiz apresentam, compreendendo um deslocamento dos *landmarks* 3,4,5,6 e 14. Por seu lado, a forma média para os espécimes do Algarve apresenta um ligeiro estreitamento na região ventral, com deslocamento do landmark 15 sensivelmente mais estreito que os demais. A comparação evidencia que as formas médias do corpo são estatisticamente diferentes entre si. A significância foi determinada após correção de Bonferroni para testes múltiplos para um erro-padrão de 0,05 ($\alpha = 0.05/4 = 0.0125$).

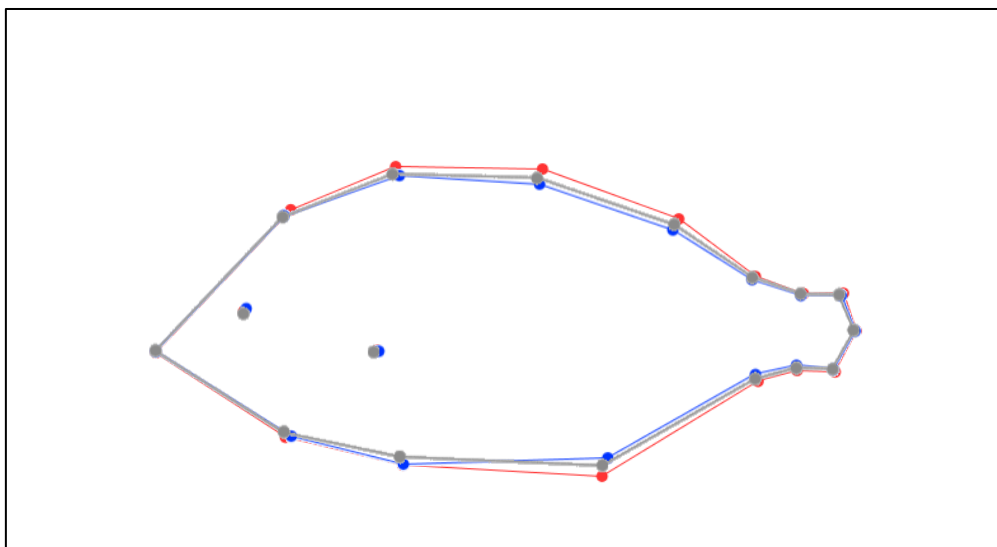


Figura 27. Forma média de Sargo-do-Senegal das 3 diferentes áreas: Algarve (Cinza); Cádiz (Vermelho); Sado (Azul).

Na projeção das duas primeiras CVA (Figura 28), as 3 áreas aparecem bem diferenciadas umas das outras. A atribuição dos espécimes de Sargo-do-Senegal, às respectivas localizações geográficas, foram corretamente classificadas em 87.2% do número total de espécimes ($K=0.751$) (Tabela 6).

Na matriz de classificação, a maior proporção de espécimes incorretamente alocados foram os do Algarve, tendo-lhe sido atribuídos 19.4% do Sado, seguindo-se os de Cádiz, com 12.9% de indivíduos incorretamente classificados e atribuídos ao Algarve. Segue-se Cádiz, com 81.4% de indivíduos corretamente identificados, e Sado com uma percentagem de correta identificação de 91.9%.

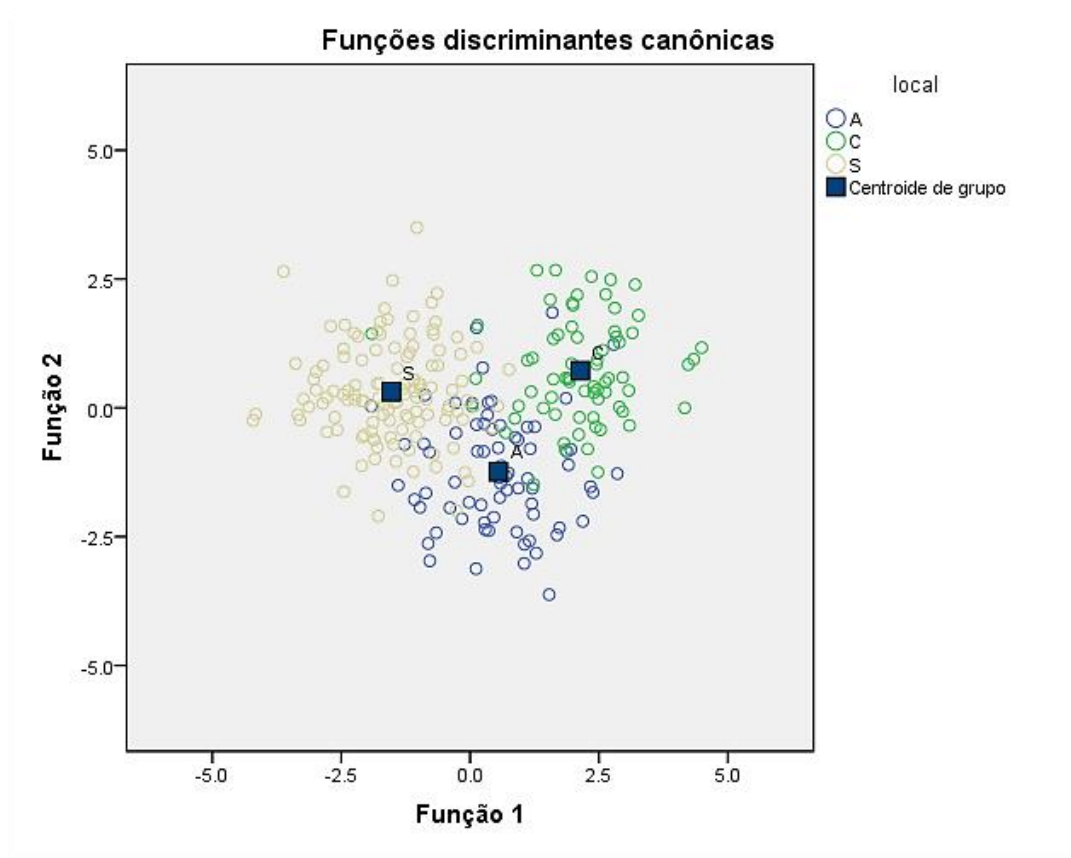


Figura 28. Alometria ontogenética para *Diplodus bellottii*, análise de variâncias canônicas (CVA) da variação da forma entre os sargos do Senegal provenientes de 3 diferentes áreas de distribuição A-Algarve; C-Cádiz; S-Sado.

Tabela 6. Matriz classificação cruzada da análise discriminante realizada em *D. bellottii* das 3 áreas de estudo no NE Atlântico. Percentagens em linhas representam a classificação nas áreas apresentadas em colunas (correta classificação em negrito). Número de indivíduos (N) corretamente classificados entre parênteses. Classificação total de sucesso: 84.2%, Lambda de Wilks = 0.183, Cohen K = 0.75

	N	Algarve	Cádiz	Sado
	72	73.6	6.9	19.4
Algarve		(53)	(5)	(14)
Cádiz	70	12.9	81.4	5.7
		(9)	(57)	(4)
Sado	124	7.3	0.8	91.9
		(9)	(1)	(114)

b) Morfologia do contorno do otólito

- Análise de imagem da forma

O otólito apresenta uma forma lanceolada, com a face dorsal arredondada, dentada por vezes até muito recortada, mas mais curta que a ventral. A face ventral é ligeiramente curva e dentada. Região posterior diagonal, ligeiramente dentada ou até mesmo fortemente sinuosa. *Rostrum* mais evidenciado que *antirostrum*. *Sulcus* superior a terminar na margem entre *rostrum* e *antirostrum*.

A média e o desvio-padrão da variância cumulativa dos harmónicos está representada na figura 29. Um máximo de 22 harmónicos (excluindo o 1º harmónico) foram precisos na análise multivariada para explicar 99% da variação na forma do otólito. Assim, cada indivíduo foi representado pelos 93 subsequentes coeficientes (1 coeficiente do harmónico 1 e 4 coeficientes dos harmónicos 2-23).

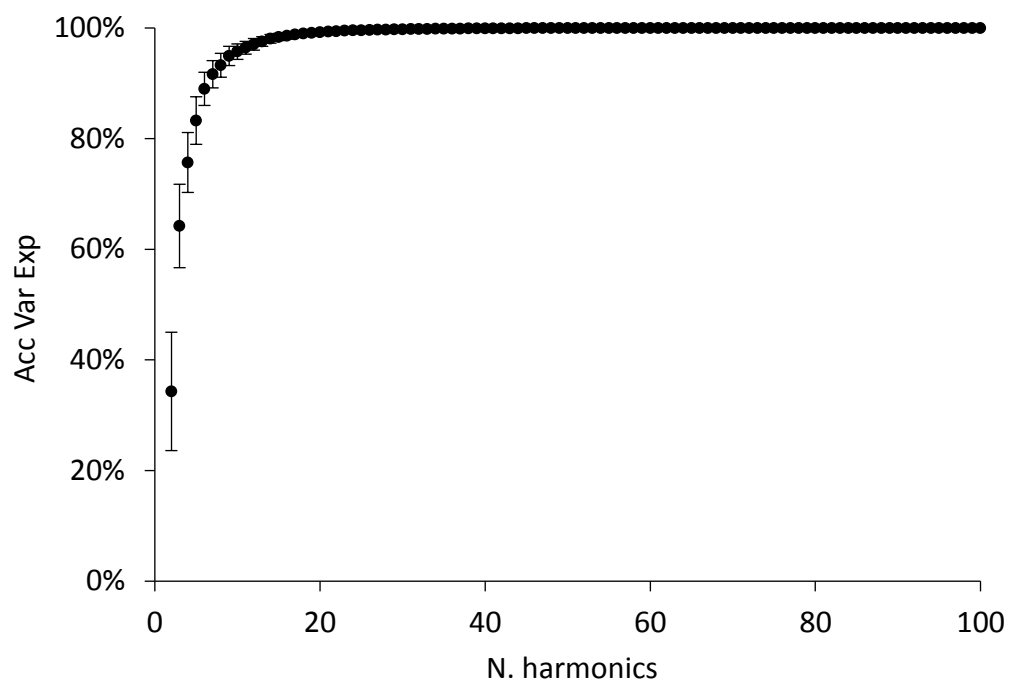


Figura 29. Média e desvio-padrão da variância cumulativa de 100 harmônicos para 10 otólitos selecionados ao acaso. Acc Var Exp: % variância acumulada explicada pelo n -ésimo harmônico.

- Análise estatística de variância

Análise estatística multivariada

O resultado do ajustamento da MANOVA para comparação dos NEFDs dos otólitos entre as 3 áreas e o sexo evidencia diferenças significativas entre as áreas, mas não entre os sexos e nem aponta para uma interação entre área-sexo (Tabela 7). Como o efeito do sexo na forma do otólito se provou não ser significativo, todas as análises subsequentes não terão em conta a separação por sexo.

Tabela 7. Sumário da MANOVA (n=228) aplicada aos NEFDs dos otólitos das 3 áreas geográficas em estudo: Algarve, Cádiz e Sado. Teste estatístico Pillai; Teste estatístico Wilks; Graus de liberdade (d.f.); *p* (valor de *p*)

	Pillai	Wilks	df.	<i>p</i>
Área	1,117	0,185	178,0	0,000
Sexo	0,416	0,584	89,0	0,353
Área:sexo	0,738	0,396	178,0	0,813

Análise discriminante canónica

Na análise discriminante foram usados 22 descritores normalizados elípticos de Fourier. A validação cruzada mostra que mais de 50% dos indivíduos estão bem classificados relativamente à área de proveniência. O Sado foi a área de melhor classificação com uma percentagem de concordância de 60% (Tabela 8).

Tabela 8. Matriz de classificação da análise discriminante entre as 3 áreas. Percentagens em linhas representam a classificação nas áreas consideradas em colunas (correta classificação em negrito). Classificação total de sucesso é de 56.6%.

%	Algarve	Cádiz	Sado
Algarve	55,6	26,4	18,1
Cádiz	25,7	52,9	21,4
Sado	23,3	16,3	60,5

Na projeção das duas primeiras CVA (Figura 30), as 3 áreas aparecem diferenciadas umas das outras, embora alguma sobreposição possa ser evidenciada. A atribuição dos espécimes de Sargo-do-Senegal, às respectivas localizações geográficas, foi corretamente classificada em 64.9% do número total de espécimes e apenas 56.6% de casos agrupados com validação cruzada, classificados corretamente.

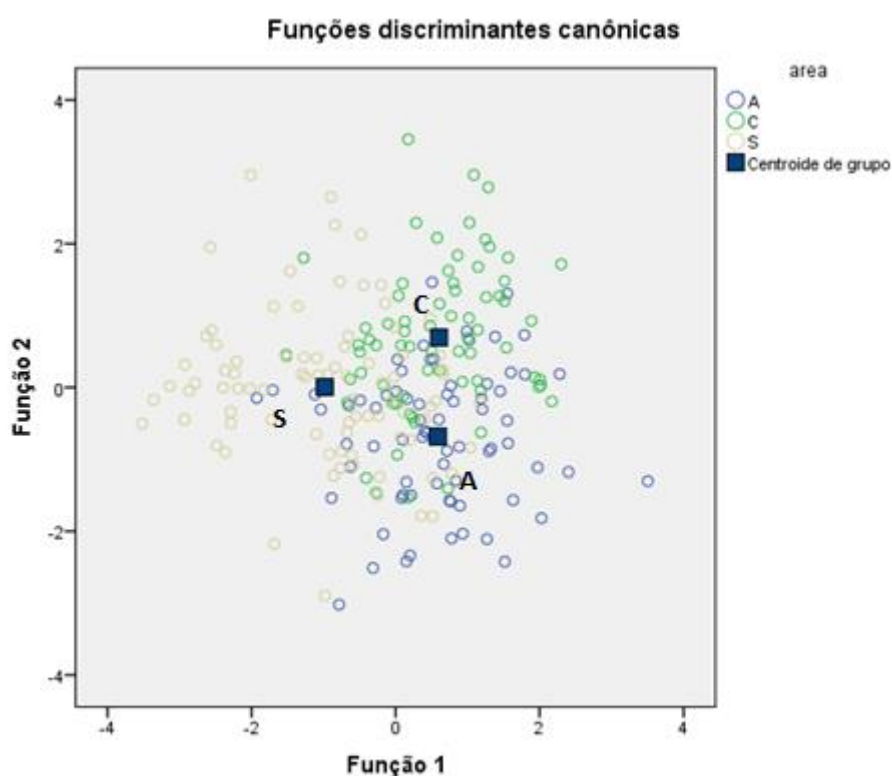


Figura 30. Análise discriminante dos indivíduos de *D. bellottii*, baseado em 17 descritores normalizados elípticos de Fourier, provenientes de 3 diferentes áreas de distribuição A-Algarve; C-Cádiz; S-Sado.

4.4 Discussão

A variação fenotípica entre stocks proporciona uma base indireta para a sua estruturação, e muito embora não forneça efetivamente uma evidência direta do isolamento genético entre os stocks, pode denunciar um afastamento prolongado dos indivíduos pós-larva em diferentes regimes ambientais (Campana et al., 1995). Por exemplo, em espécies que efetuam migrações, quer para alcançar diferentes áreas de alimentação, reprodução ou onde permanecem durante uma fase do ano, como é exemplo

o inverno, é de esperar que as semelhanças fenotípicas que exibem possam englobá-los num mesmo stock. Assim sendo, devendo-se as semelhanças fenotípicas a fatores genéticos ou mesmo a fatores de similaridade ambiental, mesmo na ausência de mistura de populações, cada população pode ser considerada um diferente stock.

A forma do corpo está intimamente ligada à condição do peixe e sujeita a fortes pressões selectivas do ambiente, o que poderá resultar numa rápida divergência genética na morfologia entre grupos de peixes, mesmo antes de haver tempo de acumulação de diferenças genéticas neutrais entre grupos (Swain e Foote, 1999), o que torna estes estudos morfométricos uma técnica valiosa.

Também na aquacultura de sparídeos, a morfometria geométrica provou ser uma útil ferramenta na detecção de alterações subtis na forma dos peixes, como as que são determinadas pelas condições de cultura (Sarà et al., 1999), podendo vir a tornar-se uma rotina para monitorizar a qualidade da cultura.

Pela distância de Procrustes, a forma média do corpo dos machos e fêmeas foi comparada, resultando na não diferenciação entre sexos. Pela MANOVA realizada aos NEFDs dos otólitos do Sargo-do-Senegal ficou igualmente provado não ser o sexo determinante na forma do otólito, por este motivo ambas as análises não contemplaram a separação dos sexos.

No presente estudo, os indivíduos das diferentes áreas mostram-se morfologicamente diferentes, de forma significativa, com uma percentagem de correta classificação por área que se situa entre os 73% e os 92%, independentemente da sua relativa proximidade geográfica. Com efeito, a maior proporção de espécimes incorretamente alocados foram os do Algarve, tendo-lhe sido atribuídos 19.4% do Sado, seguindo-se os de Cádiz com 12.9% de indivíduos incorretamente classificados e atribuídos ao Algarve. As restantes percentagens são baixas o que denota uma fiel classificação quanto à área a que pertencem, com uma exemplar taxa de correta classificação para os espécimes da Região do Sado (91.9%) e por isso baixíssimo grau de incorreção relativamente às outras duas áreas geográficas. As três áreas aparecem assim bem distintas, com os respetivos grupos centróide separados.

É, no entanto, possível que diferentes condições entre áreas afetem o crescimento dos indivíduos (como por exemplo os recursos alimentares, ocorrência de fenómenos de

upwelling, a temperatura, o seu habitat, tipo de sedimento e profundidade, e o risco de predação) (Hayes et al., 1996) e desta forma, a morfologia dos peixes nas diferentes áreas.

Pela análise elíptica de Fourier, técnica que capta as variações da completa forma do otólito e as diferenças individuais na forma do otólito a pequena escala (Campana e Casselman, 1993), mostrou-se que apenas 56.6% dos casos agrupados com validação cruzada são classificados corretamente, o que prova que a sua interpretação biológica é bem mais complexa do que a análise morfométrica linear (Stransky e MacLellan, 2005). Observou-se a existência de uma grande variabilidade na forma dos otólitos, muito embora tenham sido considerados apenas os otólitos de indivíduos cuja gama de tamanhos fosse a mais parecida possível, e garantindo que fossem, na sua maioria, já adultos, evitando a confusão com o crescimento alométrico na forma do otólito (Cardinale et al., 2004). Este pressuposto, que Campana e Casselman (1993) provaram que a análise da forma do otólito pudesse ser desvalorizada para a identificação de stocks quando aplicada a peixes sexualmente imaturos, foi no entanto ultrapassada por Cardinale et al. (2004), que demonstraram que os NEFDs são variáveis independentes do tamanho, já que os descritores elípticos de Fourier são normalizados para tamanho do otólito, rotação e ponto inicial (Kuhl e Giardina, 1982; Iwata e Ukai, 2002) de forma a reduzir os fatores de confusão na análise.

A grande variabilidade observada na forma dos otólitos dos Sargos-do-Senegal pode ter uma base genética e/ou pode refletir diferenças ambientais intra e inter áreas, o que justifica alguma sobreposição observada entre as áreas estudadas. Isto porque alguns espécimes das diferentes áreas são sujeitos a pressões ambientais similares ou partilham os mesmos traços genéticos, fatores estes que mais influenciam a forma do otólito (Farias et al., 2009). Já Cardinale et al. (2004) provaram que diferentes stocks de bacalhau apresentam formas de otólitos significativamente diferentes, mesmo sujeitos à mesma temperatura e condições de crescimento, evidenciando que diferenças genéticas entre populações podem influenciar a forma dos otólitos na ausência de diferenças relacionadas com o crescimento (Galley et al., 2006).

A variabilidade individual e a migração, para além da possível imprecisão metodológica (Campana e Casselman, 1993; Tracey et al., 2006), são outros fatores que podem constituir problemas na análise da forma do otólito.

A análise da forma do corpo e do otólito podem ser consideradas técnicas complementares para um eficiente estudo de stocks ou até mesmo para uma mais conscienciosa gestão das pescas (Cardinale et al., 2004), para além de serem ferramentas mais baratas e mais rápidas que diversas outras metodologias como a análise genética, ocorrência de parasitas e microquímica do otólito (Tracey et al., 2006). É, pois, de salientar que a melhor aproximação, e a mais eficiente, para a identificação de stocks é a que se baseia em diferentes métodos, os quais se usam por forma a se complementarem uns aos outros. Trabalhos como os de Loy et al. (1998; 2000), respetivamente em *D. vulgaris* e *D. puntazzo*, e de Sarà et al. (1999) também em *D. puntazzo* e até de Çoban et al. (2008), em *Sparus aurata*, são exemplos de análises holísticas para estudos de relações ecomorfológicas.

Em conclusão, há uma influência do ambiente na expressão fenotípica, o que pode explicar a melhor separação dos grupos populacionais das diferentes áreas, no que respeita à morfologia do corpo. Tal não se verifica tão notoriamente na outra metodologia empregue, muito provavelmente pela sua componente genotípica ser mais influente.

CAPÍTULO 5

PADRÃO FILOGEOGRÁFICO DO SARGO-DO-SENEGAL, *Diplodus bellottii*

5.1 Introdução

A genética de populações permite compreender e/ou prever os efeitos de fenómenos genéticos (tais como a segregação, a recombinação, a transposição e a mutação) sobre as populações, considerando fatores ecológicos e evolucionários, tais como a dimensão da população, os padrões de reprodução, a distribuição geográfica dos indivíduos, a migração e a seleção. É assim possível conhecer a amplitude de variação genética encontrada nas populações naturais, os processos evolutivos que moldam a estrutura genética das populações, quais os processos responsáveis pelo surgir de divergência genética entre populações e a influência das características biológicas das populações (reprodução, fecundidade, estrutura etária) (Griffiths et al., 1974; Campos, 2013).

A filogeografia define-se como o estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (Avice et al., 1987) e contempla não apenas as relações filogenéticas entre os taxa estudados, mas também os componentes históricos responsáveis pela distribuição espacial das linhagens. É uma área científica de estudo recente, com cerca de três décadas, integrativa, que usa informação genética como forma de perceber a história das populações (Beheregaray, 2008), a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, especialmente as intraespecíficas (Avice, 2000). A análise e interpretação da distribuição de linhagens requerem o processamento conjunto de informações de uma série de disciplinas, incluindo sistemática filogenética, genética de populações, etologia, demografia, paleontologia, geologia, entre outras.

Estudos em ADN extracromossómico na década de 70 evidenciaram que o ADN mitocondrial (ADNmt) de animais tem uma alta taxa de evolução e assim, desde 1975, que trabalhos que utilizam mapas de restrição em ADNmt são efetuados para estimar relações filogenéticas entre espécies de animais semelhantes (Avice, 1998). A abordagem filogeográfica clássica consiste em sobrepor uma genealogia ao mapa de distribuição das amostras analisadas, por forma a encontrar, ou não, concordância entre as linhagens e a

sua distribuição no espaço (Martins e Domingues, 2011). Relações de ancestralidade são a base da genética de populações e da sistemática filogenética, já que é pelas genealogias que ocorre a transmissão de genes e que é aberto o caminho da hereditariedade e, por sua vez, a sua impressão na filogenia (Martins e Domingues, 2011).

O caráter multidisciplinar da filogeografia, em particular das áreas do conhecimento envolvidas, faz com que esta disciplina crie uma ponte entre processos micro e macro evolutivos, dando contribuições valiosas a diversas áreas na biologia e ciências da Terra, como a especiação (Avise et al., 1998; Moritz et al., 2000; Hewitt, 2001; Kohn, 2005), biogeografia histórica (Avise, 2000; Riddle e Hafner, 2006), evolução humana (Beaumont, 2004; Templeton, 2005; Torroni et al., 2006), biologia da conservação (O'Brien, 1994; Avise e Hamrick, 1996; Smith e Wayne, 1996; Moritz e Faith, 1998; Fraser e Bernatchez, 2001; Frankham et al., 2002), biodiversidade e taxonomia (Avise e Ball, 1990; Taberlet, 1998; Beheregaray e Caccone, 2007), paleoecologia (Cruzan e Templeton, 2000), paleoclimatologia (Hewitt, 2000) e vulcanologia (Emerson, 2002).

A filogeografia pode assim ser entendida como a distribuição espacial de alelos cuja relação filogenética pode ser inferida, baseando-se não só em dados moleculares, mas também em dados morfológicos, comportamentais ou quaisquer outros, desde que analisadas através duma perspectiva filogenética ao longo duma distribuição geográfica (Avise, 2000).

A estrutura genética dos organismos marinhos pode ser modelada por fatores bióticos (ou biológicos, que dependem das preferências ambientais e ecológicas da espécie, dependem das características da sua história de vida e duração do estágio larvar no plâncton) (Wares e Cunningham, 2001) e abióticos (como a circulação dinâmica das correntes oceânicas regionais (Figura 31) e/ou eventos históricos, quer passados como presentes) (Muss et al., 2001; Sotka et al., 2004; Francisco et al., 2014b).

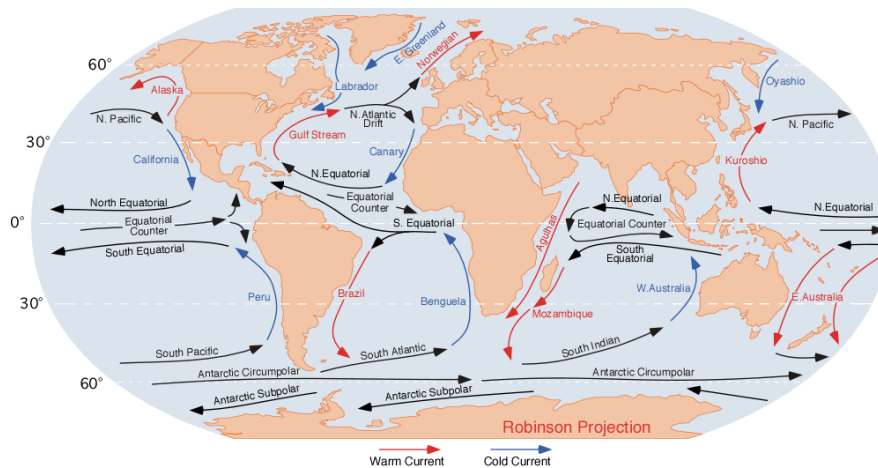


Figura 31. Mapa com as atuais principais correntes oceânicas mundiais: correntes oceânicas de superfície e sub-superfície (Fonte: www.physicalgeography.net).

Tem-se encontrado evidências de que as mudanças climáticas ocorridas têm causado alterações nas distribuições das espécies marinhas, levando-as a expandir-se, retrair-se ou a entrar em contato com outras espécies. Sendo o Atlântico Nordeste uma região de transição entre os trópicos e as regiões boreais, o seu clima tem sido muito dinâmico desde o Pleistocénico, com mudanças drásticas na temperatura da superfície do mar (Lambeck et al., 2002) e no local da frente polar durante as glaciações (CLIMAP, 1984; Alveirinho-Dias et al., 1997). Foi durante o pico das glaciações que algumas espécies sofreram uma alteração da sua área de distribuição, ocorrendo a fragmentação desta, e verificando-se o deslocamento de algumas populações para sul, ficando restringidas a refúgios (Beebee e Rowe, 2004). Tradicionalmente, na literatura, esses refúgios foram descritos a sul, onde o clima esteve relativamente protegido das alterações de temperatura dos ciclos glaciares; no entanto, nos últimos anos começaram a surgir evidências de refúgios também a norte para muitas espécies (e.g. Maggs et al., 2008). As populações de diferentes espécies marinhas variam muito nos seus padrões filogeográficos e uma visão abrangente de como a ictiofauna marinha da Europa evoluiu durante o Pleistoceno ainda carece de uma abordagem mais intensiva e profunda (e.g. Francisco et al., 2014a,b). Na literatura podemos encontrar tanto casos de panmixia sem estrutura genética ao longo da costa europeia, (como é exemplo, *Petromyzon marinus* (Almada et al., 2008), *Sprattus sprattus* (Debes et al., 2008), *Lipophrys pholis* (Francisco et al., 2011)) como casos de espécies com uma clara diferenciação populacional (ex. *Pomatoschistus microps* (Gysels et al., 2004), *Pomatoschistus minutus* (Larmuseau et al., 2009)). Existem ainda espécies para as quais a estrutura atual sugere a existência de

pequenas bolsas refugiais a norte, resultando em duas fontes de recolonização potenciais após as glaciações (ex. *Taurulus bubalis* (Almada et al., 2012)).

As genealogias obtidas também podem variar muito, desde espécies com populações que apresentam expansão após a última glaciação (ex. *Symphodus melops* (Robalo et al., 2012)), a genealogias profundas datadas do início do Pleistoceno (ex. *Pholis gunnellus* (Hickerson e Cunningham, 2006), *Gasterosteus aculeatus* (Mäkinen e Merila, 2008)).

A identificação de stocks é tema central e um importante pré-requisito nas ciências haliêuticas, envolvendo o reconhecimento de componentes autossustentáveis em populações naturais (Cadrin et al., 2014). É pois peça fundamental nas tarefas de avaliação de stocks e gestão das pescas, já que os modelos populacionais aplicados assumem que o grupo de indivíduos possui taxas vitais homogêneas (crescimento, maturação, mortalidade) e um ciclo de vida fechado, em que os novos recrutas do grupo foram produzidos nas gerações anteriores dentro do mesmo grupo. No entanto estes estudos ainda não estão desenvolvidos de forma tão expedita quanto se desejaria e a gestão das pescas acaba por ser deficitariamente aconselhada, daí que o melhoramento das ferramentas na investigação da identificação de stocks, e o consequente estímulo a estudos sobre os respetivos stocks, são a chave para uma avaliação concertada e sustentável dos recursos (Cadrin et al., 2014). Até aqui, tem sido conotado como um assunto confuso, dada a enorme variedade de abordagens, os rápidos avanços nas metodologias, os desafios nas amostragens, para além do conflito de terminologias e interpretações. Daí que as constantes revisões que têm sido feitas sobre o tópico da pesquisa da identificação de stocks, assim como súmulas concisas (Simon e Larkin, 1972; Templeman, 1982; Pawson e Jennings, 1996; Waldman, 1999) e encontros de divulgação de procedimentos, com apresentação de casos de estudo (Ihssen et al., 1981; Kumpf et al., 1987; Begg et al., 1999a,b), têm sido um importante motor para o seu desenvolvimento.

Um exemplo, em que a informação sobre a estrutura genética duma população visa ser usada para delinear as unidades de gestão e monitorizar a exploração de espécies que se encontram intensamente exploradas ou até em declínio da sua abundância, como é o caso duma espécie de tubarão, *Carcharhinus obscurus* (Benavides et al., 2011) que é sujeito a sobre-exploração, devido ao comércio de barbatanas de tubarão. Neste caso foi analisado parte da região de controlo (mtCR) em indivíduos de 8 regiões dispersas

geograficamente, tendo sido identificados 25 haplótipos e detetada diferenciação significativa entre 3 unidades de gestão: US Atlântico, África do Sul e Austrália, e mostrando ser possível que simulações da análise de mistura de stocks (MAS), usando sequências mtCR, possam contribuir para a reconstrução das contribuições relativas de cada unidade de gestão para o comércio asiático de barbatanas de tubarão. Estudos semelhantes têm também sido conduzidos em sparídeos, mais especificamente em *Diplodus sargus* (Domingues et al., 2007; Lenfant, 2003) e para além desta espécie também *D. vulgaris*, em que se pretende ter o conhecimento da estrutura genética populacional (Pereira et al, 2010; Arculeo et al., 2003), antes de levar a cabo qualquer projeto de valorização de stocks (Cross, 2000) ou de repovoamento, através da análise genética molecular (Ward, 2006). Outros trabalhos pretendem inferir na diferenciação genética e fluxo genético de duas subespécies, *D. sargus cadenati* e *D. sargus sargus* (González-Wanguemert et al., 2006) evidenciando que estudos genéticos usando ADN mitocondrial e marcadores microssatélites podem facilitar a resolução de diferenciação genética entre subespécies e ainda melhorar a qualidade dos dados disponíveis para decisões de gestão.

Mais exemplos de trabalhos realizados noutras espécies de interesse, são o *Halobatrachus didactylus* ao longo da costa Portuguesa (Robalo et al., 2013b), onde se sugere que mesmo pequenas oscilações na temperatura de superfície do mar podem ocasionar extinções locais e subsequentes recolonizações em populações de peixes termofílicos que se encontram nos mais frios limites da sua distribuição. Outro ainda, o estudo das relações filogenéticas entre espécies de *Gaidropsaurus* do Atlântico Norte e ainda entre os 3 géneros: *Gaidropsarus*, *Ciliata* e *Enchelyopus*, onde se desafia o status das espécies *Gaidropsarus mediterraneus* e *Gaidropsarus guttatus* e faz crescer dúvidas relativamente à distinção de outras espécies, sendo sugerida uma revisão taxonómica deste género (Francisco et al., 2014).

Um outro exemplo, também alvo deste tipo de estudos é *Labrus bergylta*, uma espécie que tem sido avaliada ao longo da sua faixa de distribuição, em termos da sua estrutura populacional e padrão filogeográfico, como forma de interpretar a sua resposta às atuais alterações ambientais ao longo do tempo (Almada et al., 2017). A marcada estrutura populacional encontrada reflete a recolonização desta espécie a partir de três distintos refúgios glaciares e os padrões da circulação oceanográfica, passados e presentes.

De la Paz (1973) reconstruiu ele próprio a filogenia do género *Diplodus* na base da sua coloração e dentição, sugerindo ter origem e primeira diversificação na região Mediterrâneo-Atlântico Este, e acreditando serem todas as espécies deste género, que ocorrem noutras regiões, como sendo descendentes do agrupamento de (sub) - espécies *D. sargus* L. Numa análise filogenética, baseada no segmento mitocondrial 16S rDNA com 486bp (pares de bases), de 24 espécies de sparídeos do Atlântico-Nordeste e Mediterrâneo, foi indicada a sub-divisão da família Sparidae em 3 grandes linhas (Hanel e Sturmbauer, 2000), embora discordando com o declarado por Fiedler (1991), que se baseava na morfologia. A filogenia do género *Diplodus*, não pôde, no entanto, ser completamente resolvido tendo por base apenas o 16S rDNA, dada a idade evolutiva do grupo relativamente recente e a sua rápida diversificação.

Como foi já referido, o Sargo-do-Senegal é uma espécie de distribuição subtropical (37°N - 13°N) (Froese e Pauli, 2014) que ocorre normalmente entre os 30 e 50 metros de profundidade (Schneider, 1990), desde o Sul de Espanha até ao estuário do Sine-Saloum no Senegal, incluindo ainda as ilhas do Arquipélago de Cabo Verde (Diouf, 1996.). É, no entanto, importante realçar algumas alterações a esta área de distribuição, já que Froese e Pauli (2014) referem a sua presença em Cabo Verde e os inúmeros contactos independentes efetuados neste arquipélago, junto de pescadores e biólogos, na tentativa de obter amostras, se revelaram infrutíferos. De acordo com investigadores residentes (comunicações pessoais) estas referências sobre a presença da espécie não são mais do que identificações erradas, nomeadamente por confusão com outras espécies do mesmo género que aí ocorrem. Por outro lado, o Sargo-do-Senegal tem vindo a ser uma espécie cada vez mais abundante na costa portuguesa. Desde os primeiros registos na década de 90 que ocorreram na costa Algarvia, que a espécie foi alargando para Norte o limite da sua área de distribuição, tornando-se uma espécie relativamente frequente e mesmo alvo de pesca em algumas zonas do país (pelo menos até à latitude de Lisboa).

A costa oeste de Portugal é uma importante zona de transição biogeográfica temperada (Henriques et al., 1999, Lima et al., 2007). A variabilidade sazonal das condições oceanográficas tem sido bem estudada nestas águas costeiras (Relvas et al., 2007, Sánchez et al., 2007). Ecologicamente, esta região marca o limite de distribuição norte e sul de inúmeras espécies com afinidade, respetivamente, para o quente e o frio (Henriques et al., 1999, 2007; Lima et al., 2007). Este é também o limite norte do evento de *upwelling* do Atlântico Nordeste.

Já tinha sido referido anteriormente que o Atlântico Nordeste é uma região de transição entre os trópicos e regiões boreais e seu clima tem sido muito dinâmico desde o Pleistocénico. No presente, a costa portuguesa representa, de uma certa forma, esse limite. Henriques et al. (2007) demonstraram que a abundância das espécies é bastante sensível às condições climáticas em Portugal. Enquanto em anos com invernos frios, as espécies boreais podem ser avistadas com alguma consistência, em anos com invernos quentes, as mesmas espécies deixam de ser detetáveis nos censos subtidais. Num estudo sobre alterações da ictiofauna de peixes no Estuário do Tejo, Cabral et al. (2001) observaram que, enquanto algumas espécies de afinidades tropicais como *Diplodus bellottii* estão a ser detetadas em números crescentes, espécies predominantemente boreais, como o Gadídeo *Ciliata mustela*, se tornam raras a sul.

Neste estudo, a região de controlo da mitocôndria (CR, ADN mitocondrial) e o primeiro intrão do gene codificante da proteína ribossómica nuclear S7 (S7, ADN nuclear) foram usados para avaliar a estrutura populacional, as assinaturas de eventos expansão/contração retidos nas genealogias e potenciais refúgios glaciais, fragmentos estes que, por já terem sido usados em várias espécies de peixes (Robalo et al., 2011), incluindo espécies de sparídeos, entre as quais do género *Diplodus* (Summerer et al., 2001; Domingues et al., 2007), permitem comparações.

O conhecimento do padrão filogeográfico das populações de *Diplodus bellottii* ao longo da sua área de distribuição permite compreender até que ponto as populações portuguesas, sendo recentes, apresentam uma diminuição da diversidade genética quando comparadas com as populações a sul, mais antigas, e pertencentes à área de distribuição original da espécie. Pretende-se com este estudo apresentar a filogeografia do Sargo-do-Senegal, dado que, relativamente à espécie que abordamos, não se encontram trabalhos realizados e/ou publicados.

5.2 Material e métodos

Amostragem

Amostras de *Diplodus bellottii* foram recolhidas com o objetivo de identificar a estrutura populacional do Sargo-do-Senegal no sul do Atlântico Nordeste, tendo-se amostrado 15 a 30 indivíduos de 4 locais distintos, ao longo da sua área de distribuição: costa ocidental Portuguesa - região centro (Tejo e Sado), costa Algarvia, Golfo de Cádiz

e Maurítânia. Os peixes foram, na sua maioria, apanhados em canais junto à costa ou capturados por pesca artesanal dirigida, usando o anzol ou redes de arrasto e de emalhar, por pescadores locais de cada zona, durante o período de fevereiro 2013 a outubro 2014. Quando possível, uma amostra de tecido da barbatana foi imediatamente preservada em etanol 96%, para posterior análise molecular. Os restantes peixes foram congelados, e descongelados no momento precedente à análise laboratorial para a obtenção de tecido. Para além da identificação dos indivíduos, o seu comprimento total (Lt., aprox. 0,1 cm) e o sexo foram registados.

Extração, amplificação e sequenciação de ADN

A extração de ADN genómico total foi realizada com o *kit* REDEExtract-N-pf (Sigma-Aldrich), seguindo as instruções do fabricante. A amplificação por PCR da região de controlo mitocondrial (CR) e do primeiro intrão do gene da proteína ribossomal nuclear S7 (S7) foram realizados com os seguintes pares de iniciadores: CR— LPro1 (5'-ACTCT CACCC CTAGC TCCCA AAG- 3') e HDL1 (5'-CCTGA AGTAG GAACC AGATG CCAG-3') (Ostellari et al., 1996) e S7 — S7RPEX1F (5'-TGG CTT CCT CCT TGG GCC TC-3') e S7RPEX2R (5'-AAC TCT TCG GGC TCG TTT CC-3') (Chow e Hazama, 1998).

As reacções em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) foram realizadas num volume total de reacção 20 µl, com 10 µl de mistura REDEExtract-N-ampl reacção de PCR (Sigma-Aldrich), 0,8 µl de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*, 10 µl), 4,4 µl de água Sigma e 4 µl do ADN do indivíduo. Uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min foi seguida por 35 ciclos (desnaturação a 92°C por 30/45 seg, emparelhamento a 50°C/56°C por 30/60 seg e extensão a 72°C por 1 min; valores para CR/S7, respetivamente) e uma extensão final a 72°C por 10 min num termociclador BioRad Mycycler. Os mesmos *primers* foram utilizados nas reacções de sequenciação e os produtos de PCR foram purificados e sequenciados na STABVIDA (<http://www.stabvida.net/>).

As sequências foram editadas com o *software* CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/index.htm>), alinhadas com Clustal X 2.1 (Larkin et al., 2007) e posteriormente depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (Accession numbers MF120288-MF120372; e MF120408-MF120464, respetivamente para o CR e o S7).

Análise de ADN

Para a análise genética de indivíduos da região de Lisboa, Algarve, Cádiz e Mauritânia, foram considerados 144 indivíduos estando descrito o número de indivíduos de cada local por fragmento (CR e S7) nas tabelas 5 e 6, respetivamente.

Para ambos os fragmentos, as redes de haplótipos foram construídas com o *software* TCS v.1.21 (Clemente et al., 2000) utilizando o método da parcimónia (Templeton et al., 1992).

No que respeita à estrutura populacional da amostra, a relação entre populações é avaliada em função das distâncias genéticas entre as populações. O *software* ARLEQUIN package v.3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) foi utilizado para estimar a diversidade genética dentro de cada amostra, para o fragmento CR (região de controle da mitocôndria) e para o S7 (primeiro intrão), para aceder à potencial diferenciação populacional e para aplicar testes de neutralidade. Foi ainda usado para executar a análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992) e para estimar os FSTs e as diferenças emparelhadas corrigidas entre populações. O número de migrantes foi calculado para cada população usando o mesmo *software*.

Uma análise de incompatibilidade (Rogers e Harpending, 1992; Rogers, 1995) e os testes Fs de Fu (Fu, 1997) e D de Tajima (Tajima, 1983) foram realizados no ARLEQUIN para testar possíveis gargalos e expansão (demográfica e espacial) da população. Na análise de incompatibilidade, os parâmetros τ , θ_0 , θ_1 e M e os intervalos de confiança, foram obtidos por uma abordagem de bootstrap paramétrico usando 10 000 replicados. O tamanho da população efetiva foi calculado antes (N_0) e após (N_1) um inesperado evento de expansão, o tamanho da população efetiva antes dum evento de expansão espacial (N), o tempo desde a expansão (t, em anos), e a taxa de migração (m), usando equações $\tau = 2\mu\tau$ e $\theta = 2N\mu$.

Foi utilizada uma abordagem Markov Chain Monte Carlo, MCMC (implementada no *software* LAMARC 2.1.9; Kuhner, 2006), tendo em conta as relações filogenéticas entre os haplótipos, para estimar o tamanho efetivo da população (N_{ef}), o parâmetro de crescimento exponencial (g) e as taxas de migração entre grupos adjacentes de populações. Para calcular as estimativas de tamanho efetivo da população, e as suas

alterações com o tempo e a idade das populações, foram utilizadas as seguintes taxas de mutação: 5% para CR (Bowen et al., 2006) e 0,23% para o S7 (Bernardi e Lape, 2005).

A demografia populacional passada de *D. bellottii* foi inferida usando o Bayesian Skyline Plot (BSP) (Drummond et al., 2005) implementado em BEAST v.1.7 (Drummond e Rambaut 2007), utilizando o método de coalescência MCMC e um relógio estrito. A distribuição Bayesiana foi gerada usando os resultados de cinco testes independentes de 150 milhões de MCMC, com um burn-in de 10%. O tempo para o ancestral comum mais recente (t_{MRCA}) e a mediana e respectivos intervalos de credibilidade da BSP foram visualizados usando o *software* Tracer v.1.5 (Rambaut e Drummond, 2007).

5.3 Resultados

Diversidade genética e análise filogenética

Região de controlo mitocondrial

Um fragmento de 357 pares de bases foi obtido, após o alinhamento, para a região de controlo (CR). Foram obtidas 85 sequências, representando 80 haplótipos, com um total de 441 sítios polimórficos. As diferenças entre os haplótipos corresponderam a 288 transições, 56 transversões e 7 inserções/deleções. Todos os locais de amostragem apresentam grande diversidade genética (Tabela 9).

Primeiro intrão do gene codificante da proteína ribossomal S7

O gene S7 foi amplificado em 57 indivíduos (diplóides). Foram obtidas 114 sequências correspondendo a 108 haplótipos distintos. O fragmento obtido, após alinhamento, foi de 544 pares de bases, com um total de 305 sítios polimórficos. As diferenças entre os haplótipos incluíram 168 transições, 161 transversões e 3 inserções/deleções (Tabela 10).

Tabela 9. Número, haplótipos, medidas de diversidade para as sequências de CR de *D. bellottii*, para os grupos populacionais dos diferentes locais de amostragem neste estudo.

CR(Dloop)

Locais	<i>N</i>	NH	Diversidade Haplótica \pm SD	Diversidade Nucleotídica \pm SD	Número Médio da Diferença de Emparelhamento \pm SD
Portugal-Centro	45	44	0.99+/- 0.005	0.0594+/- 0.0294	23.832+/-10.674
Portugal-Sul	11	11	1.00+/- 0.0388	0.0488+/- 0.0269	18.254+/-8.7831
Cádiz	16	16	1.00+/- 0.0221	0.0725+/- 0.0373	28.958+/-13.375
Mauritânia	13	13	1.00+/- 0.0302	0.0925+/- 0.0482	37.179+/-17.313

N- número de indivíduos por local, NH- número de haplótipos

Tabela 10. Número, haplótipos, medidas de diversidade para as sequências de S7 de *D. bellottii*, para os grupos populacionais dos diferentes locais de amostragem neste estudo.

Locais	S7(primeiro intrão)		Diversidade Nucleotídica \pm SD	Número Médio da Diferença de Emparelhamento \pm SD	Loci Polimórfico
	<i>N</i>	NH			
Portugal-Centro	78(39)	75	0.037 +/- 0.0186	21.47519	131
Portugal-Sul	24(12)	24	0.048 +/- 0.0244	28.52174	96
Cádiz	4(2)	4	0.017 +/- 0.0119	16.5	18
Mauritânia	12(6)	10	0.0417 +/- 0.0227	25.81818	60

N- número de indivíduos por local, NH- número de haplótipos

A rede de haplótipos para o CR e S7 são visíveis, respetivamente, nas figuras 32 e 33.

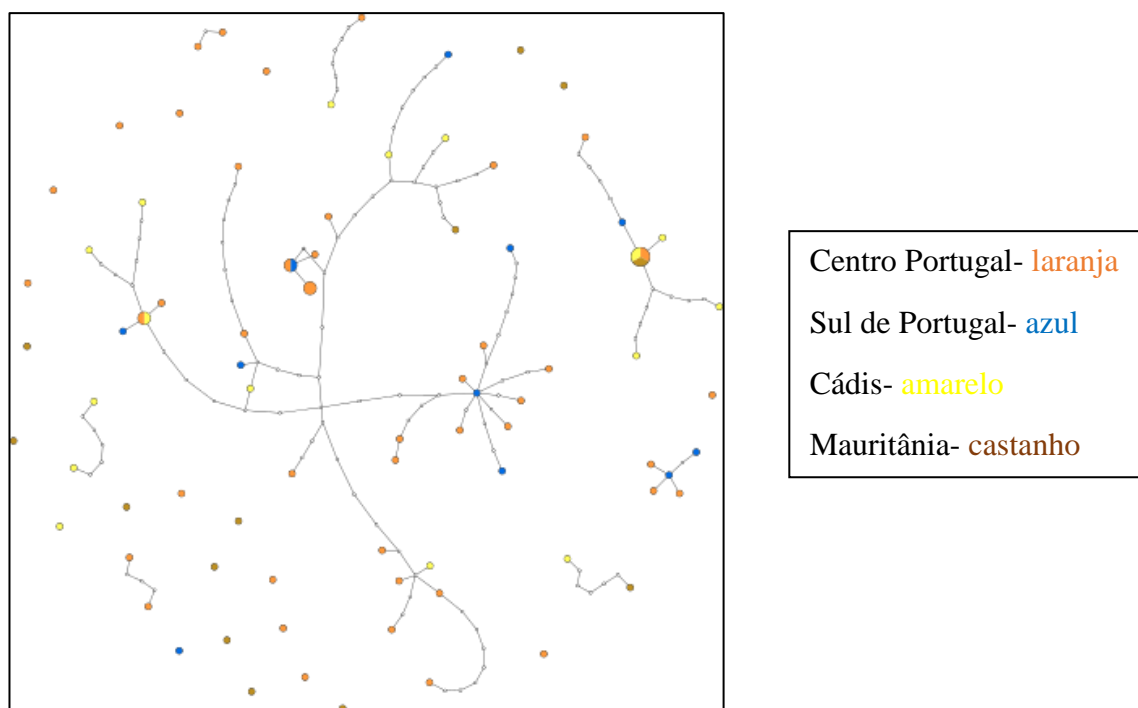


Figura 32. Rede de haplótipos para o CR de *D. bellottii*. Nos haplótipos partilhados entre regiões, o sombreamento é proporcional à frequência do haplótipo em cada região. A área dos círculos é proporcional à frequência de cada haplótipo.

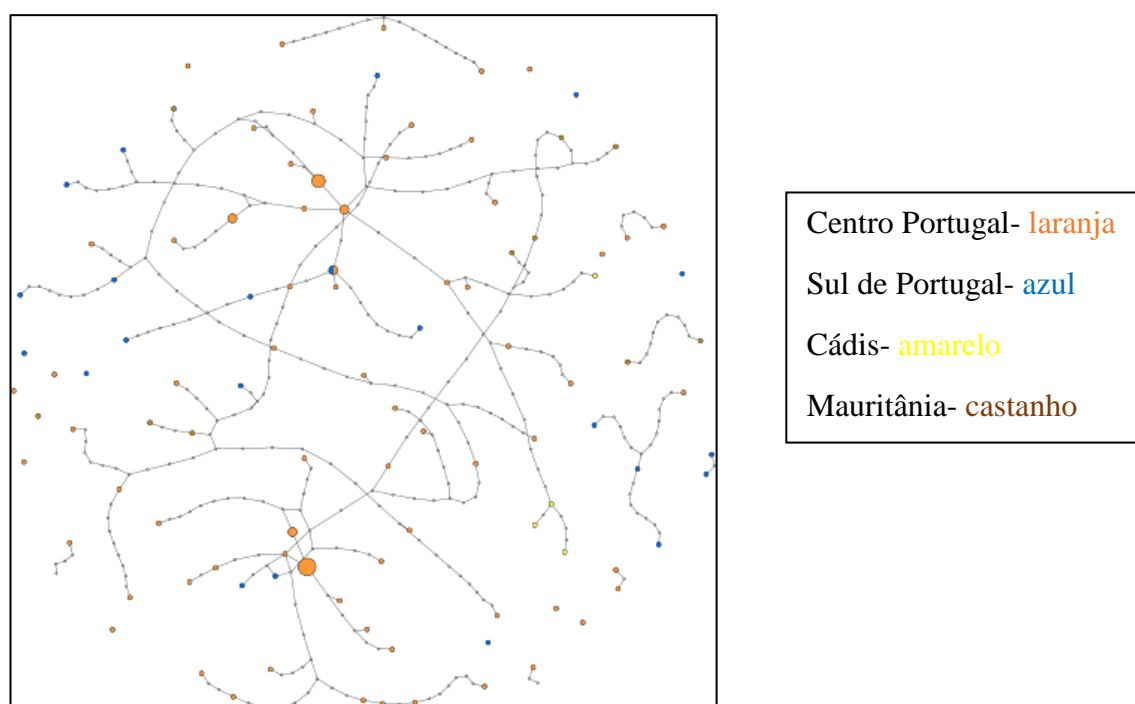


Figura 33. Rede de haplótipos para o S7 de *D. bellottii*. Nos haplótipos partilhados entre regiões, o sombreamento é proporcional à frequência do haplótipo em cada região. A área dos círculos é proporcional à frequência de cada haplótipo.

Ambas as redes são complexas e muito ramificadas, com muitos haplótipos isolados, sendo visíveis os haplótipos partilhados em ambas as figuras. Não há evidência de qualquer estrutura relacionada com os locais de amostragem. Foram observados apenas quatro haplótipos partilhados entre as regiões: centro de Portugal, Cádiz e Mauritânia; centro e sul de Portugal; centro de Portugal e Cádiz; e por último centro de Portugal.

As análises de AMOVA, calculadas para ambos os marcadores, não revelaram uma estrutura genética ao longo da área de distribuição de *D.bellottii* (CR: $F_{ST} = 0,026$, $p < 0,05$; S7: $F_{ST} = 0,01829$, $p < 0,05$). A diferenciação genética e o fluxo génico entre os pontos de amostragem, para o Sargo-do-Senegal, estão apresentados na tabela 11. Para o CR, apenas foram encontrados F_{ST} não significativos, exceto entre a região centro de Portugal e Cádiz (valores a negrito), que apresentam diferenças significativas.

Tabela 11. Fluxo génico entre locais amostrados de *Diplodus bellottii*: Distâncias F_{STs} (abaixo da diagonal) e N_m (número de migrantes; acima da diagonal), calculados por marcador.

Population pairwise F_{STs}	Portugal Centro	Portugal Sul	Cádiz	Mauritânia
Portugal Centro	0	Inf	10.377	Inf
Portugal Sul	-0.01676 (0.81081+-0.0304)	0	6.196	10.913
Cádiz	0.04597 (0.00901+-0.0091)	0.07466 (0.06306+-0.0273)	0	Inf
Mauritânia	-0.07676 (0.99099+-0.0030)	0.04381 (0.99099+-0.0030)	-0.00944 (0.99099+-0.0030)	0

CR F_{ST} : valores p entre parênteses; 110 permutações

Population pairwise F_{STs}	Portugal Centro	Portugal Sul	Cádiz	Mauritânia
Portugal Centro	0	18.977	3.097	7.846
Portugal Sul	0.02567 (0.24324+-0.0408)	0	3.669	Inf
Cádiz	0.139 (0.03604+-0.0148)	0.11992 (0.33333+-0.0360)	0	1.908
Mauritânia	0.0599 (0.17117+-0.0344)	-0.00877 (0.94595+-0.0205)	0.20759 (0.20721+-0.0305)	0

S7 F_{ST} : valores p entre parênteses; 110 permutações

O conjunto de dados do S7 revelou uma distribuição igualmente não estruturada de *D. bellottii* e sem diferenças significativas, para além da referida anteriormente, entre o centro de Portugal e Cádiz (valores a negrito) (Tabela 11). Para ambos os fragmentos, o número de migrantes foi consistente (Nm na ordem da 1 dezena ou inferior) para pares das áreas consideradas, que indica a existência de fluxo entre os diferentes locais, e que está de acordo com os resultados da AMOVA e dos Fst (que foram não significativos, exceto entre Portugal centro e Cádiz), atingindo um valor mais elevado entre os locais centro e sul de Portugal, no caso do S7 (Nm > 18; Tabela 11).

A tabela 12 apresenta as distâncias FST médias corrigidas entre populações, os valores médios de emparelhamento dentro de cada população e o número médio da diferença de emparelhamento entre populações. Apenas a região Centro Portugal e Cádiz apresentam valores significativos.

Tabela 12. Distâncias médias corrigidas entre populações (após retirada a variabilidade intra-populacional; abaixo da diagonal); valores médios de emparelhamento dentro de cada população (elementos da diagonal); número médio da diferença de emparelhamento entre populações (acima da diagonal).

Distâncias médias emparelhadas das populações	Portugal Lisboa	Portugal Algarve	Cádiz	Mauritânia
Portugal Lisboa	23.832	20.862	27.501	22.133
Portugal Algarve	-0.180	18.254	25.755	19.091
Cádiz	1.106	2.149	28.958	28.687
Mauritânia	10.217	9.963	14.208	0

CR valores a negrito indicam significância a $p < 0.05$, após correção com Q value

Distâncias médias emparelhadas das populações	Portugal Lisboa	Portugal Algarve	Cádiz	Mauritânia
Portugal Lisboa	20.509	23.798	19.506	22.844
Portugal Algarve	0.479	26.129	22.795	24.309
Cádiz	4.585	5.063	9.333	22.2
Mauritânia	1.223	-0.122	6.166	22.733

S7 valores a negrito indicam significância a $p < 0.05$, após correção com Q value

Em virtude de não se ter verificado uma estruturação genética nas diferentes áreas, foram agrupadas todas as amostras numa única população e as análises seguintes são feitas em dois conjuntos de dados apenas, um para o CR e outro para o S7, cada um com as sequências de todas as proveniências geográficas. Os resultados dos testes de neutralidade seletiva de mutações, tanto para análise do CR, como do S7, indicaram valores negativos e significativos para F_s de F_u ($p < 0.05$) (CR: -24.003; S7: -24.049), sugerindo crescimento populacional (Tabela 13). De acordo com estes índices, considera-se a população em expansão quando os valores são negativos e significativos o que se verifica para o F_s apenas, e não para o D de Tajima.

As análises de distribuição de incompatibilidade sugerem expansão demográfica e espacial para ambos os marcadores (Tabela 13). O tempo estimado para a expansão demográfica foi de aproximadamente 165 milhares de anos para o CR; enquanto para o S7, o tempo estimado para expansões demográficas foi cerca de 8 milhões de anos. Um tempo de igual ordem de grandeza, de 165 milhares de anos, foi estimado para a expansão espacial quando se considera o conjunto de dados CR, enquanto para o S7 os tempos estimados de expansão espacial apresentaram valores na ordem dos 7 milhões de anos para estas costas (Tabela 13). O número de migrantes de *D. bellottii*, referente ao modelo de expansão espacial da análise Mismatch para o CR (1,862,178,771) foi mais elevada do que para o S7 (50,108,652). Para os dados agrupados, as distribuições de incompatibilidade para o CR e S7 são compatíveis com ambos os modelos de expansão, quer demográfico, quer espacial, para a população de *D. bellottii*. Para o S7, no entanto, o modelo de expansão demográfico tem um ajuste ligeiramente melhor (SSD mais baixo, Tabela 13). Os resultados obtidos através do Lamarc foram geralmente consistentes com os obtidos a partir das análises de distribuição de incompatibilidade (Tabela 13).

Tabela 13. Parâmetros demográficos de *Diplodus bellottii* baseado no CR e S7.

Teste de Neutralidade: F_s (F_u 's), D (Tajima's) (valores de p a negrito). Distribuição Incompatibilidade: t (tempo em milhares de anos, 95% CI entre parênteses, N_0 (tamanho população efetiva de fêmeas após expansão), SSD (Soma dos desvios quadrados), H_{ri} (Índice Harpending's Raggedness). Estimativa parâmetros da população com LAMARC: (θ), N_f (tamanho efetivo da população fêmeas), G (Taxa de crescimento) e $N_1\%$ (idade da população, como a idade na qual N_f diminui abaixo de 1%). Estimativa de t_{MRCA} (tempo ao mais recente ancestral comum) com BEAST.

	CR	S7
Testes de Neutralidade		
F_s	-24.003 (0.000)	-24.049 (0.000)
D	-0.774 (0.233)	-0.750 (0.253)
Distribuição Incompatibilidade		
Expansão Demográfica		
t (95%CI)(ky)	165.852(112.241-585.901)	8.089.110(6.403.229-11.330.531)
N_0	498.243	1.337.468
N_1	94.137.803	30.880.355
SSD	0.01339	0.00117
H_{ri}	0.00182	0.0018
Expansão Espacial		
t (95%CI)(ky)	165.452(114.800-848.113)	7.032.429(5.748.769-9.214.814)
N	498.874	2.630.303
N_m	1.862.178.771	50.108.652
SSD	0.01339	0.00324
H_{ri}	0.00182	0.0018
LAMARC		
θ (95% CI)	1.584(0.89-3.08)	0.45(0.225-0.987)
N_f (95%CI)	15.849.810(8.900.217-30.875.493)	97.868.641(49.101.761-214.695.870)
G (95%CI)	46.0904(27.227-67.263)	117.7936(58.76-184.49)
$N_1\%$ (95%CI)(ky)	1.998.319(3.382.725-1.369.283)	16.997.924(34.070.032-10.852.421)
BEAST		
t_{MRCA} (95% CI) (ky)	2046.47(1621.23-2567.27)	16183.3(11908.93-21446.77)

As figuras 34 e 35 mostram a BSP (Bayesian Skyline Plot) gerada pelo BEAST, respectivamente para o CR e o S7 de *D. bellottii*. O Nef está em escala logarítmica para melhor visualização da sua variação ao longo do tempo.

A BSP mostra que o Sargo-do-Senegal, como uma única população, persistiu por mais de 1,5 milhares de anos com um número baixo e experimentou um rápido crescimento populacional, mais expressivo para o S7, que nos remete para um

crescimento contínuo ao longo dos últimos 12 mil anos, ao longo da escala de tempo, não obstante para o CR este aumento apenas tenha ocorrido nos últimos 100 anos.

Os resultados demográficos estimados com LAMARC, para o CR e S7, de *D.bellottii*, confirmam o BSP revelando uma longa persistência de pelo menos 1,998 milhões de anos (Tabela 9). Dada a incerteza associada com a taxa de divergência adotada, e os grandes erros envolvidos na estimativa, os valores de Nef obtidos com ambos os métodos não são discordantes.

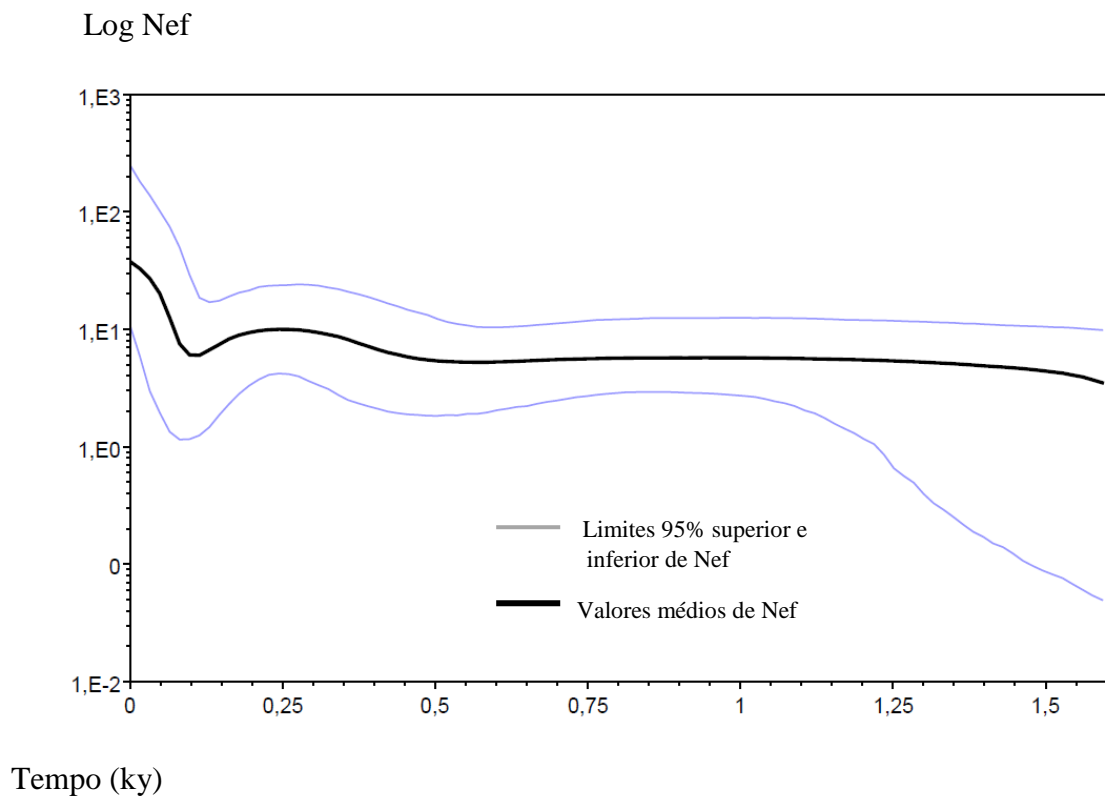
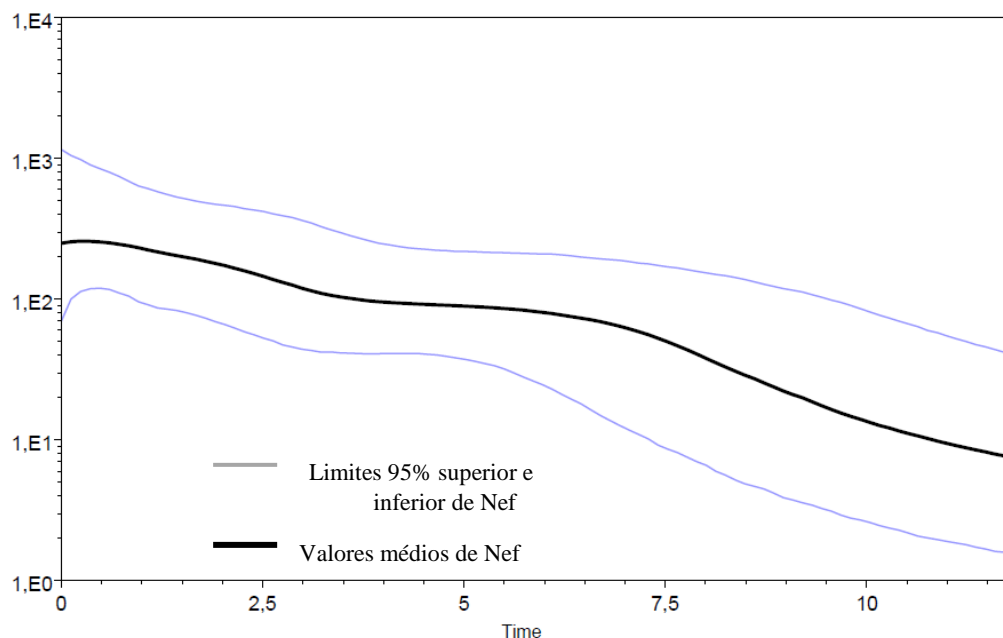


Figura 34. Bayesian Skyline Plot, BSP, em escala Logarítmica, para o CR de *Diplodus bellottii* (Nef-tamanho população efetiva; Tempo- milhares de anos).

Log Nef



Tempo (ky)

Figura 35. Bayesian Skyline Plot, BSP, em escala Logarítmica, para o S7 de *Diplodus bellottii* (Nef-tamanho população efetiva; Tempo- milhares de anos).

O tempo para o antepassado mais recente, t_{MRCA} , estimado com base nos referidos marcadores, está igualmente expresso na tabela 9 e é de 2 milhões de anos para o CR e de 16 milhões de anos para o S7.

5.4 Discussão

Este estudo suporta claramente a existência duma elevada diversidade genética, quer intra, quer inter-populacional e estamos na presença apenas de uma população. Como foi apontado, a diversidade genética da espécie foi elevada em toda a área amostrada, atingindo valores máximos nos locais de amostragem Cádiz e Mauritânia. Esta diversidade genética intra-populacional é de elevada importância para a adaptação dos

indivíduos às alterações ambientais e consequentemente, a longo-termo, à sobrevivência da espécie (Pereira et al., 2010).

Não se pode apontar uma diferenciação geográfica já que a variabilidade é muito grande dentro de toda a distribuição amostrada. Relativamente à espécie em estudo, *Diplodus bellottii* é uma espécie com características ecológicas pouco conhecidas, mas estritamente ligada a ambientes costeiros rochosos ou arenosos e com capacidade de dispersão limitada. No entanto, sendo uma espécie de ovos e larvas pelágicos (Harmelin-Vivien et al., 1995), a sua dispersão é facilitada pelas correntes oceânicas na sua fase de vida pelágica. Apesar de alguns trabalhos argumentarem que existe uma forte correlação entre a duração do período de larvas pelágicas com a estimativa do F_{ST} (Faurby e Barber, 2012), outros argumentam refutando esta hipótese (Weersing e Toonen, 2009; Francisco et al., 2011). Este é um desses casos, que não se verifica uma estrutura genética apesar da colonização se dever ao transporte pelágico, quer dos ovos ou larvas.

Seria esperado que em espécies colonizadoras que invadem um novo habitat, como é comum acontecer, fosse observado um “efeito gargalo”, com redução drástica de diversidade genética nestas zonas limites da área de distribuição para a espécie, seguindo-se um efeito fundador por alguns elementos dessa espécie. Verificar-se-ia desta forma o desaparecimento de muitas variantes genéticas (no caso da maioria das mutações não serem adaptativas), restando somente algumas, o que apenas favorece a distribuição da espécie e abre caminho para os mais adaptados. Daí resultaria que um pequeno grupo daria início a uma nova população (Canning-Clode, 2015). Aqui não há vestígio deste efeito, no entanto ocorre uma enorme diversidade genética disseminada por toda a área amostrada. Heterozigosidade pode ser usado como uma medida da capacidade de uma população responder a seleção, imediatamente após um gargalo de garrafa.

Assim, na generalidade os dados apontam para uma única população desta espécie, com elevada diversidade genética e ausência de estrutura geográfica. Estes resultados são surpreendentes, dado a presença relativamente recente desta espécie nos locais a norte da sua habitual área de distribuição, facto esse que faria prever uma diversidade mais reduzida nesses locais de áreas limítrofes (Robalo et al., 2013a,b).

Na bibliografia são encontrados estudos sobre outras espécies que, tal como esta, têm em Portugal Continental os seus limites de distribuição e apresentam grandes diversidades genéticas embora numa ordem de grandeza inferior relativamente às

diversidades encontradas para *D. bellottii*. Como exemplo, os trabalhos que testam como hipótese o papel que a tolerância à temperatura tem na formação da estrutura genética observada nos organismos costeiros europeus (Almada et al., 2012), como é o caso das espécies *Ciliata mustela* (Robalo et al., 2014) e *Taurulus bubalis* (Almada et al., 2012) que, sendo tipicamente de águas frias, encontram em Portugal o seu limite sul de distribuição. A primeira espécie, não revelou subdivisão entre as amostras do Atlântico e do Mar do Norte, apresentando valores semelhantes de índices de diversidade genética ao longo da área amostrada, padrão este muito diferente do que seria esperado como postulado, para explicar a baixa diversidade no limite sul de distribuição duma espécie, diversidade esta que é apresentada como consequência das sucessivas fundações pós-glaciares de novas populações em frentes avançadas (Robalo et al., 2014). A espécie *T. bubalis* por sua vez, que também apresenta grande variabilidade genética (mesmo estando no limite sul da sua área de distribuição), e que apenas se dispersa durante a fase larvar já que, quer os adultos, quer os ovos, são essencialmente sedentários (os ovos são guardados pelos machos até eclosão), tem apresentado uma crescente abundância nas águas da costa portuguesa apesar de muito raramente se reproduzir nesta localização geográfica, especialmente em anos de águas quentes (Almada et al., 2012)

No caso de *Halobatrachus didactylus* (Robalo et al., 2013b), sendo uma espécie tipicamente de águas quentes, tem Portugal como limite norte da sua distribuição, tal como a espécie deste estudo *Diplodus bellottii*, no entanto, praticamente não apresenta variabilidade genética. Trata-se de uma espécie cujos requisitos habitacionais são muito próprios, já que não apresenta um estágio pelágico, sendo de natureza sedentária, uma espécie que apenas desova em condições de temperatura das águas acima dos 18°C e que em verões frios, quando a temperatura baixa para além deste ponto, o chamamento dos machos para acasalamento é suprimido e são raros os ninhos com presença de ovos (Amorim et al., 2006).

Este é o primeiro trabalho de filogeografia de *D. bellottii*. Apesar de ser um contributo interessante para o estudo desta espécie, com um eventual crescente valor comercial no nosso país, tem algumas limitações que importa ressaltar. Embora este fator seja tido em conta nas análises e por isso a sua importância seja relativa, verifica-se alguma heterogeneidade na amostragem por local. Seria importante aumentar o número de indivíduos capturados, embora provavelmente, de acordo com os resultados obtidos, isso resultasse apenas num aumento da diversidade. Adicionalmente seria muito

interessante avaliar a variação genética dos alelos ao longo do tempo, com o objetivo de distinguir uma tendência consistente de uma alteração esporádica anual. Trabalhos adicionais, com marcadores mais finos, permitindo uma abordagem de genómica de paisagens marinhas (genomic seascapes), serão cruciais para a compreensão da filogeografia desta espécie assim como para a avaliação de potenciais mecanismos adaptativos relacionados com a temperatura e condições ecológicas e oceanográficas relacionadas com as alterações climáticas. No entanto, um dos principais problemas neste estudo é a ausência de amostras cobrindo a larga extensão de distribuição geográfica da espécie, quer África tropical e sub-tropical, onde as amostras são de obtenção extremamente difícil. No futuro, a possibilidade de uma colaboração internacional tornará possível examinar em profundidade os processos filogeográficos que afetam a espécie.

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo pretendeu-se recolher informações fundamentais do ponto de vista biológico, para o conhecimento duma espécie de sparídeo, *Diplodus bellottii*, nas águas da costa portuguesa e a sua estrutura populacional.

Para cumprir os objetivos propostos foram recolhidos e amostrados Sargos-do-Senegal da região centro de Portugal Continental, numa base mensal, durante o ciclo anual, de acordo com a disponibilidade da espécie, com recurso à pesca artesanal, quer pela arte xávega, as redes de emalhar, ou arrasto e também por aparelho de anzol nos estuários dos rios Tejo e Sado, tendo-se intensificado a amostragem por mais ciclos anuais, principalmente durante a época de desova, para o estudo da reprodução. Para o estudo de identificação de stocks, para além das amostras já conseguidas da região centro de Portugal, foram ainda recolhidas amostras de 3 outras áreas geográficas, Algarve, Cádiz (Espanha) e Mauritânia, exemplares gentilmente cedidos, de cruzeiros de investigação realizados pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), de recolhas realizadas pelo ICMAN-CSIC (Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía) em Cádiz, e da Mauritânia, apenas para a análise molecular.

Em estudos de estrutura de populações, a variabilidade individual inerente é um fator importante. Por isso, cada técnica foi aplicada aos mesmos indivíduos, para não aumentar ainda mais a componente da variabilidade, eliminando assim a incerteza associada (Abaunza et al., 2008). Para minimizar o efeito da variabilidade individual, dadas as especificações de cada metodologia, os exemplares foram selecionados e cumpridos os principais critérios: ser o mesmo indivíduo usado em todas as metodologias, quando possível; serem considerados para análise apenas os adultos; considerar semelhante intervalo de comprimento total entre as áreas; e considerar amostragens na mesma época para as diversas áreas.

No que se refere à Biologia da espécie, são abordados 2 temas. No primeiro, para o estudo da idade e crescimento foi obtida informação referente ao crescimento do Sargo-do-Senegal da região centro da costa portuguesa (Capítulo 2), não existindo qualquer informação anterior disponível nesta espécie para comparação, assim qualquer

comparação apenas pode ser feita com outras espécies dentro do mesmo género. Os principais resultados obtidos contribuíram para a determinação do comprimento total no 1º ano de crescimento do peixe e o estabelecimento da taxa de crescimento para esta espécie. Assim, conclui-se ser o Sargo-do-Senegal uma espécie de crescimento moderado e vida relativamente curta. A idade máxima estimada neste estudo, pela leitura dos otólitos, foi de 9 anos, que iguala a encontrada por Man-Wai e Quignard (1984) em *D. sargus sargus* do Golfo de Léon, e dentro de valores relativamente próximos, esta mesma espécie no Mar Cantábrico (Pastor e Villegas Cuadros, 1996) e na costa Catalã (Gordoa e Moli, 1997). Sendo a correta determinação da idade dos peixes importante componente para a tomada de decisão no que compreende a gestão das pescas (Weatherley e Gill, 1987), é de privilegiar no futuro, estudos comparativos com aplicação de diferentes metodologias de determinação de idade às mesmas amostras.

Durante a realização deste trabalho, com a necessidade de amostrar indivíduos de classes de tamanho inferiores, foram capturados juvenis de *Diplodus sp.* na Lagoa de Óbidos que, pela observação dos caracteres morfológicos definidos por Bauchot e Hureau (1990) para a identificação da espécie, foram identificados como *D. bellottii*. No entanto, análises genéticas posteriores identificaram estes mesmos indivíduos como sendo *D. vulgaris*, nuns casos, e *D. sargus*, noutros. Este facto realça a dificuldade no uso dos caracteres morfológicos para a identificação de juvenis desta espécie. Fica por avaliar, através da genética, a possibilidade destes indivíduos serem híbridos, uma vez que, tendo sido apenas amplificado o ADN mitocondrial, só podemos inferir com certeza a identidade do seu progenitor materno.

No que diz respeito ao 2º tema, neste trabalho foi possível monitorizar o ciclo anual reprodutor para a espécie, assim como os parâmetros reprodutivos (Capítulo 3). Estes estudos são o começo para que a fecundidade desta espécie possa ser corretamente estimada, um parâmetro crucial para o conhecimento da dinâmica populacional (Hilborn e Walters, 1992; Richard e Kestenmont, 2003), permitindo estimar o potencial reprodutivo, assim como quantificar a capacidade reprodutiva individual (Murua et al., 2003). Este foi também o primeiro trabalho a caracterizar o ciclo sexual nesta espécie, que descreve a época de desova entre abril e junho, apresentando uma sincronicidade entre machos e fêmeas.

Os dados, que refletem a evolução dos índices bioenergéticos ao longo do ciclo de maturação de machos e fêmeas, mostram que o pico do IGS coincide com o estado de

desova em ambos os sexos, altura em que as gónadas se encontram no seu desenvolvimento máximo, e por essa razão, peso máximo também. Nas fêmeas, o IHS máximo coincide com os estádios de desenvolvimento avançado, ou seja, estágio de postura, o que sugere que as reservas hepáticas são usadas na vitelogénese. Nos machos não se verificam alterações significativas, sendo a amplitude de variação na ordem de grandeza de 0.2-0.3, podendo apontar o atingir do valor máximo em outubro e o valor mínimo em dezembro. As reservas musculares não parecem ter um papel activo no processo de maturação das gónadas, já que não se verificam alterações significativas, apenas oscilações de ordem de grandeza de 0.1 a 0.15, detectadas em K ao longo do ciclo anual, para ambos os sexos. Foram determinadas as ogivas de maturação para ambos os sexos, indicando comprimentos à 1ª maturação de 8,7 cm para machos e 10,6 cm para fêmeas. Tais valores constituem informações importantes a considerar em futuras medidas de gestão do recurso.

Relativamente ao tipo de fecundidade, não se pode concluir sobre a estratégia que a espécie segue mas há uma maior probabilidade de a espécie ter fecundidade indeterminada, ou seja, denota haver um contínuo recrutamento de oócitos ao longo da época de reprodução.

Uma outra abordagem neste estudo prende-se com a estrutura populacional desta espécie na área estudada. O conceito de stock é fundamental para a gestão dos recursos pesqueiros sendo a unidade base à qual os modelos populacionais são aplicados (Abaunza et al., 2008). A definição de stock, em geral, está em paralelo com o conceito de população (Waldman, 1999), mas é normalmente usada para referir a componente explorada duma determinada espécie (Shaklee e Currens, 2003). A identificação dum stock de peixes baseia-se num número de características distintivas sendo que a variação entre stocks depende de fatores ambientais e genéticos. As características fenotípicas que um stock apresenta estão relacionadas a características ambientais, ao passo que as características fenotípicas entre stocks estão associadas à sua região geográfica (Begg e Waldman, 1999).

Para o estudo da estrutura de stocks a melhor ferramenta é uma aproximação multidisciplinar, cujos resultados de diferentes métodos e técnicas, são comparados e usados de forma complementar. Begg e Waldman (1999) apontam uma aproximação holística como a que utiliza múltiplas técnicas para a identificação de stocks de peixe, devendo, simultaneamente, ser aplicadas às mesmas amostras. Dentro dos caracteres usados para identificar stocks de peixe, há os puramente genéticos, os puramente

ambientais e os que refletem variações quer genéticas, quer ambientais (Swain et al., 2005). Este trabalho contempla o estudo morfométrico e de análise molecular.

Para o estudo morfométrico, este trabalho envolveu a aplicação de 2 metodologias usadas na estrutura populacional, a morfometria geométrica do corpo e a análise do contorno do otólito. O primeiro, baseado nos landmarks, mostrou a existência de diferenças significativas na forma média do corpo dos Sargos-do-Senegal entre as 3 áreas consideradas (Estuário Sado, Algarve, Cádiz) usando a distância de Procrustes, tendo-se provado a não existência de diferenças entre os sexos. A classificação global de sucesso de 84.2%, obtida na discriminação das 3 populações, apresenta um valor bastante elevado. O Algarve foi a área onde se verificou a maior percentagem de indivíduos mal classificados. De acordo com estes resultados, as populações do Sado, Algarve e Cádiz parecem bem diferenciadas umas das outras, mesmo estando as áreas geograficamente perto, principalmente Algarve e Cádiz. Tal poderá dever-se à existência de diferentes condições ambientais (como exemplo, abundância/escassez de recursos alimentares, risco de predação, temperatura, profundidade, tipo de sedimento) o que afeta o crescimento dos indivíduos (Hayes et al., 1996) e por isso a sua morfologia. Por outro lado, as condições oceanográficas e hidrobiológicas que se verificam ao longo da plataforma e vertente continental influenciam também as condições citadas anteriormente.

A análise da forma do otólito foi aplicada na identificação de stocks do Sargo-do-Senegal, usando descritores elípticos de Fourier. Pela MANOVA não se determinaram diferenças entre os sexos, mas foram reveladas diferenças entre os espécimes das 3 áreas. A classificação global de sucesso, de 56.6%, é efetivamente baixa. O Sado foi o local que apresentou a classificação correta mais elevada (60.5%). É de registar que a variabilidade encontrada na forma dos otólitos é efetivamente grande, mesmo para uma determinada área geográfica amostrada, o que poderá ter contribuído para os baixos valores de indivíduos correctamente classificados em cada área.

Por último, a análise molecular que evidencia uma enorme diversidade genética entre os indivíduos dentro de uma mesma área geográfica, e mesmo entre as diferentes áreas consideradas, e que não nos dá uma estrutura populacional evidente; por essa razão se fala de uma única população com uma enorme diversidade génica. Assim, é de salientar que há uma influência do ambiente na expressão fenotípica, o que pode explicar a melhor separação dos grupos populacionais das diferentes áreas, no que respeita à morfologia do corpo. Tal não se verifica tão notoriamente nas outras 2 metodologias empregues, muito

provavelmente pela sua componente genotípica ser mais influente. A análise molecular foi aplicada a esta espécie na procura duma evidência de estrutura de stocks no Atlântico Nordeste tendo-se obtido ausência de estrutura populacional. Migração entre estas populações pode provavelmente ocorrer, pelo transporte dos ovos pelágicos ou mesmo das larvas, permitindo efetivamente alterações genéticas, mesmo em distâncias consideráveis. De qualquer forma, e sendo este um peixe oriundo da costa africana, mais precisamente do estuário de um rio no Senegal, a sua distribuição cada vez mais para Norte denota uma deslocação da espécie, muito provavelmente devido às alterações climáticas e, em consequência, do aquecimento climático da água no Oceano Atlântico, especialmente no Atlântico Nordeste (Cabral et al., 2001).

Segundo Horta e Costa (2014), o efeito primário previsto pelo aquecimento das águas oceânicas é uma mudança na abundância das espécies e limites de distribuição, que pode causar dramáticas alterações na abundância das espécies e por conseguinte nas cadeias tróficas (Perry et al., 2005). Alterações à escala latitudinal de espécies marinhas têm já sido largamente descritas (Perry et al., 2005; Hawkins et al., 2009; Figueira e Booth, 2010; Cheung et al., 2009, 2012; Nicastro et al., 2013; Wernberg et al., 2013) e mostrado afetar ecossistemas e as pescas (Sumaila et al., 2011; Cheung et al., 2013).

Vinagre et al. (2014) adiantam os limites de tolerância térmica desta espécie invasiva, concluindo que a recente expansão da distribuição geográfica, que compreende a mudança de um sistema de upwelling tropical, que ocorre na costa ocidental africana (média de temperaturas 20-25°C), para um sistema de upwelling de zona temperada/subtropical, que ocorre na costa ocidental portuguesa, claramente mais frio (média de temperaturas 15-18°C) (Levitus & Boyer, 1994), foi possível por um enfraquecimento do sistema de upwelling de Portugal (Lemos & Pires, 2004) e consequente aumento na temperatura, tornando possível a colonização desta zona por esta espécie. No entanto, uma vez que ficou provado que a sua sensibilidade termal a 30°C é muito superior que a temperaturas mais baixas, e se verifica um pronunciado aumento do seu metabolismo e demonstrada incapacidade de aclimatização a esta temperatura, um acréscimo na temperatura no futuro, associado à alteração climática, que durante as ondas quentes no verão pode atingir temperaturas próximas deste limite (atualmente de 28°C, por um período de mais de uma semana), poderá causar um stress térmico a estes juvenis. As movimentações para norte de espécies do sul, subtropicais, como *D. bellottii*, cujo primeiro aparecimento no estuário do Tejo ocorreu em 1995, e o aumento acelerado na

sua abundância foi notada nos dois anos subsequentes (Cabral et al., 2001), é para Stebbing et al. (2002) reflexo do aquecimento das águas. Vinagre et al. (2009) aplicaram modelos lineares generalizados (GLM) tendo obtido uma relação positiva com temperatura de superfície da água do mar (SST), o que mostra a relação desta tendência crescente da sua distribuição para norte com o aquecimento climático. Segundo Nicholas et al. (2011), alterações observadas na distribuição de espécies de peixes relacionadas com alterações climáticas são explicadas por duas importantes razões ecológicas: um ajuste da sua faixa de temperatura e a influência desta no sucesso de diferentes fases do seu ciclo de vida, especialmente o recrutamento de juvenis marinhos (Moutain, 2002; Hermant et al., 2010).

A distribuição latitudinal de espécies de peixe que usam o estuário para completar na totalidade o seu ciclo de vida, como é o caso desta espécie, tem-se deslocado progressivamente para norte, como consequência expectável do aquecimento global verificado nas últimas décadas (Nicolas et al., 2011). *Diplodus bellottii* está associado a estuários com grandes áreas e elevados volumes, mas apenas em estuários situados a sul da Ria de Aveiro (40°38'N), como o Tejo e o Sado, preferencialmente em zonas pouco profundas, reiterando a importância destas zonas estuarinas como áreas de maternidade e desenvolvimento dos juvenis, dadas as elevadas densidades que são encontradas (Vinagre et al., 2010).

Segundo Canning-Clode (2015), a taxa de invasões detetadas em ecossistemas quer terrestres, quer aquáticos, tem crescido significativamente nas duas últimas décadas, por várias razões: não só porque se tem incrementado o esforço na sua procura, com subsequente investigação por equipas especializadas, em vários continentes e abarcando diferentes disciplinas; mas também porque se beneficia do desenvolvimento e prática das novas abordagens moleculares; e por último, mas não menos importante, como consequência das alterações climáticas. Sendo Portugal uma área fronteira de duas regiões, a tropical e a temperada, por conseguinte fronteira de espécies tropicais, temperado-quentes e temperado-frias, boreais, torna-se de extrema importância na avaliação dos efeitos do aquecimento global (Henriques et al., 2007) e estes estudos assumem um papel fundamental para o conhecimento, avaliação e até previsão da mudanças que vão sendo detetadas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abaunza P., Murta A.G., Campbell N., Cimmaruta R., Comesaña A.S., Dahl G., Gallo E., García Santamaria M.T., Gordo, L.S., Iversen S.A., MacKenzie K., Magoulas A., Mattiucci S., Molloy J., Nascetti G., Pinto A.L., Quinta R., Ramos P., Ruggi A., Sanjuan A., Santos A.T., Stransky C., Zimmermann C. 2008. Considerations on sampling strategies for a holistic approach to stock identification: The example of HOMSIR Project. *Fisheries Research* 89: 104-113.
- Abecassis D., Bentes L., Coelho R., Correia C., Lino P.G., Monteiro P., Gonçalves J.M.S., Ribeiro J., Erzini K. 2008. Ageing seabreams: A comparative study between scales and otoliths. *Fisheries Research* 89: 37-48.
- Adams D.C., Rholf F.J., Slice D.E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology* 71:5-16.
- Amorim M.C.P., Vasconcelos R.O., Marques J.F., Almada F. 2006. Seasonal variation of sound production in the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Journal of Fish Biology* 69: 1892-1899.
- Almada F., Francisco S.M., Lima C.S., FitzGerald R., Mirimin L., Villegas-Ríos D., Saborido-Rey F., Afonso P., Morato T., Bexiga S., Robalo J.I. 2017. Historical gene flow constraints in a northeastern Atlantic fish: phylogeography of the ballan wrasse *Labrus bergylta* across its distribution range. *Royal Society Open Science* 4: 160773.
- Almada V.C., Almada F., Francisco S. M., Castilho, R., Robalo, J.I. 2012. Unexpected High Genetic Diversity at the Extreme Northern Geographic Limit of *Taurulus bubalis* (Euphrasen, 1786), *PLOS ONE* 7 (8): e44404 - e44404.
- Almada V.C., Pereira A.M., Robalo J.I., Fonseca J.P., Levy A., Maia C., Valente A. 2008. Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea-lampreys along European shores. *Mol Phylogenet Evol* 46:391–396.
- Alós J., Palmer M., Alonso-Fernández A., Morales-Nin B. 2010. Individual variability and sex-related differences in the growth of *Diplodus annularis* (Linnaeus, 1758). *Fisheries Research* 101(1-2): 60-69.
- Alós J., Palmer M. 2009. Mortality of *Diplodus annularis* and *Lithognathus mormyrus* released by recreational anglers: implications for recreational fisheries management. *Fisheries Management and Ecology* 16: 298–305.
- Alveirinho-Dias J.M. et al. 1997. Evolução da linha de costa, em Portugal, desde o último máximo glaciário até à actualidade: síntese dos conhecimentos. *Estudos do Quaternário. APEQ*, Lisboa. 53-66.
- Armstrong M.J., Witthames P.R. 2012. Developments in understanding of fecundity of fish stocks in relation to egg production methods for estimating spawning stock biomass. *Fisheries Research* 117: 35–47.
- Avice J.C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., Saunderson N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA Bridge

between Population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

Avise J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.

Avise J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 464p.

Avise J.C., Ball Jr. R.M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biol.* 7: 45-67.

Avise J.C., Hamrick J.L. 1996. *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Springer US. 512p.

Avise J.C., Walker D., Johns G.C. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 1707–1712.

Bagenal T.B., Tesck F.W. (1978). Age and growth. In Bagenal, T.B. (Ed.). *Methods for assessment of fish production in fresh waters*. Oxford. UK, Blackwell Scientific Publications 101-136.

Bancroft J.D., Gamble M. 2002. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone. 5th edition.

Bargelloni L., Alarcon J.A., Alvarez M.C., Penzo E., Magoulas A., Palma J. 2005. The Atlantic–Mediterranean transition: Discordant genetic patterns in two seabream species, *Diplodus puntazzo* (Cetti) and *Diplodus sargus* (L.). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36 (3): 523-535.

Bauchot M.L., Hureau J.C. 1986. Sparidae. In Whitehead, P. J. P., Bauchot, M. L., Hureau, J. C., Nielsen, J. and Tortonese, E. (eds) *Fishes of the NorthEastern Atlantic and the Mediterranean*, Vol. 2. UNESCO, Paris.

Bauchot, M.L., J.C. Hureau. 1990. Sparidae. p. 790-812. In J.C. Quero, J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds.) *Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA)*. JNICT, Lisbon; SEI, Paris; and UNESCO, Paris. Vol. 2.

Baylac M., Frieß M. 2005. Fourier descriptors, Procrustes superimposition, and data dimensionality: an exemple of cranial shape analysis in modern human populations. In *Modern morphometrics in physical anthropology*. Slice D.E. (ed.) New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 145-165p.

Beamish R.J., Fournier D.A. 1981. A method for comparing the precision of a set of age determination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 982-983.

Beamish R.J., McFarlane G.A. 1983. The Forgotten Requirement for Age Validation in Fisheries Biology. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(6): 735-743.

Beaumont M.A., Balding D.J. 2004 Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology* 13: 969–980.

- Beckman D.W., Wilson C.A. 1995. Seasonal timing of opaque zone formation in fish otoliths. In Recent developments in fish otolith research. Secor D.H., Dean J.M., Campana S.E. (eds.) University of South Carolina Press, Columbia, SC, USA. 27–43p.
- Beebee T., Rowe G. 2004. An Introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press Inc. New York.
- Begg G.A., Waldman J.R. 1999. A holistic approach to fish stock identification. Fisheries Research 43: 35– 44.
- Begg G.A., Friedland K.D., Pearce J.B. 1999a. Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. Fisheries Research 43: 1-8.
- Begg G.A., Hare J.A., Sheehan D.D. 1999b. The role of life history parameters as indicators of stock structure. Fisheries Research 43: 141-163.
- Begg G. A., Brown R.W. 2000. Stock identification of haddock *Melanogrammus aeglefinus* on Georges Bank based on otolith shape analysis. Transactions of the American Fisheries Society 129: 935– 945.
- Beheregaray L.B., Caccone A. 2007. Cryptic biodiversity in a changing world. Journal of Biology, 6(4): 9. doi: 10.1186/jbiol60. Epub 2007 Dec 21.
- Bell J.D., Harmelin-Vivien M.L. 1983. Fish fauna of French *Mediterranean Posidonia oceanica* seagrass meadows. 2. Feeding habits. Tethys 11: 1-14.
- Benavides M.T., Horn R.L., Feldheim K.A., Shivji M.S., Clarke S.C., Wintner S., Natanson L., Braccini M., Boomer J.J., Gulak S.J.B., Chapman D.D. 2011. Global phylogeography of the dusky shark *Carcharhinus obscurus*: implications for fisheries management and monitoring the shark fin trade. Endangered Species Research 14: 13– 22.
- Benchalel W., Kara M.H. 2013. Age, growth and reproduction of the white seabream *Diplodus sargus sargus* (Linnaeus, 1758) off the eastern coast of Algeria. Journal of Applied Ichthyology, 29: 64-70.
- Bernardi G., Lape J. 2005. Tempo and mode of speciation in the Baja California disjunct fish species *Anisotremus davidsonii*. Molecular Ecology 14:4085–4096.
- Beverton R.J., Holt S.J. 1957. On the dynamics of exploited fish populations. Fish. Invest. London Ser. 2: 533p.
- Biagi F., Tunesi L., Vacchi M. 1995. Visual underwater census of sparid juveniles of the genus *Diplodus* in the waters of Liguria and Toscana. Biologia Marina Mediterranea 2: 461-463.
- Birstein V.J., Desalle R. 1998. Molecular phylogeny of Acipenserinae. Molecular Phylogenetics and Evolution 9: 141-155.
- Blanche J., Cadenat J., Stauch A. 1970. Clés de détermination des poissons de mer signalés dans l'Atlantique oriental. Faune Tropicale XVIII. ORSTOM. Paris. 479p.

- Boas F. 1905. The Horizontal Plane of the Skull and the General Problem of the Comparison of Variable Forms. *Science* 21: 862–863.
- Bookstein F.L. 1986. Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. (With discussion and rejoinder). *Statistical Science* 1: 181– 242.
- Bookstein F.L. 1989. Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations. *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence* 11: 567–585.
- Bookstein F.L. 1991. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, New York. 435p.
- Bookstein F.L. 1996. Combining the tools of geometric morphometrics. In Marcus L. F., Corti M., Loy A., Naylor G., Slice D.E (Eds), *Advances in Morphometrics*. NATO ASI Series A: Life Sciences vol.284. Plenum Publishing, New York. 131–151p.
- Bowen B.W., Bass A.L., Muss A.J., Robertson D.R. 2006. Phylogeography of two Atlantic squirrelfishes (family Holocentridae): Exploring links between pelagic larval dispersal and population connectivity. *Marine Biology* 149:899–913.
- Braga F.M.S. 1986. Estudo entre fator de condição e relação peso / comprimento para alguns peixes marinhos. *Revista Brasileira de Biologia*., Rio de Janeiro 46: 339-346.
- Brown-Peterson N.J., Wyanski D.M., Saborido-Rey F, Macewicz B.J., Lowerre-Barbieri S.K.. 2011. A Standardized Terminology for Describing Reproductive Development in Fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management and Ecosystem Science* 3: 52-70.
- Buxton C.D., Garratt P.A. 1990. Alternative reproductive styles in seabreams (Pisces. Sparidae). *Environment Biology of Fishes* 28: 113-124.
- Cabral H.N., Costa M.J., Salgado J.P. 2001. Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes? *Climate research* 18(1): 119-126.
- Cadenat J. 1950. *Poissons de mer du Sénégal*. Initiations Africaines. IFAN III
- Cadrin S.X., Friedland K.D. 1999. The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fisheries Research* 43: 129- 139.
- Cadrin S.X. 2000. Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 91–112.
- Cadrin S.X., Friedland K.D., Waldman J.R. 2005. *Stock Identification Methods. Applications in Fishery Science*. Elsevier, Amsterdam, 719p.
- Cadrin S.X., Kerr L.A., Mariani S. 2014. *Stock Identification Methods. Applications in Fishery Science*. Elsevier, Amsterdam, 566p.
- Cailliet G.M., Andrews A.H. 2008. Age-validated longevity of fishes: its importance for sustainable fisheries. In Tsukamoto K., Kawamura T., Takeuchi T., Beard T.D. Jr and Kaiser M.J. (eds) *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress 2008. Tokyo: TERRAPUB: 103–120.

- Campana S.E. 1995. Cod stock discrimination using ICPS elemental assays of otolith. Univ. South Carolina Press. 671-691.
- Campana S.E. 2001. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *Journal of Fish Biology*, 59: 197-242.
- Campana S.E., Gagné J.A., McLaren J.W. 1995. Elemental fingerprinting of fish otoliths using ID-ICPMS. *Marine Ecology Progress Series* 122: 115–120.
- Campana S.E., Casselman J.M. 1993. Stock discrimination using otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 1062-1083.
- Campos R (Ed.) et al. 2013. Um livro sobre evolução. CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos. Porto, Portugal.
- Canning-Clode (Ed.) J. 2015. *Biological Invasions in Changing Ecosystems Vectors, Ecological Impacts, Management and Predictions*. De Gruyter Open Ltd, Warsaw/Berlin. 474p.
- Cardinale M., Doering-Arjes P., Kastowshy M. e Mosegaard H. 2004. Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 61: 158-167.
- Carvalho J.R., Hauser L. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 326-350.
- Casselman, J.M., 1987. Determination of age and growth. In Weatherley, A.H. & H.S. Gill (Eds.). *The biology of fish growth*. Orlando, USA. Academic Press. 209-242p.
- Chang W.Y.B. 1982. A statistical method for evaluating the re-productibility of age determination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 1208-1210.
- Cheung W.W.L., Lam V.W.Y., Sarmiento J.L., Kearney K., Watson R., Pauly D. 2009. Projecting global marine biodiversity impacts under climate change scenarios. *Fish Fisheries* 10: 235–251.
- Cheung W.W.L., Meeuwig J.J., Feng M., Harvey E. 2012. Climate-change induced tropicalization of marine communities in Western Australia. *Marine Freshwater Research* 63: 415–427.
- Cheung W.W.L., Watson R., Pauly D. 2013. Signature of ocean warming in global fisheries catch. *Nature* 497: 365–368.
- Chow S, Hazama K (1998) Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Molecular Ecology* 7:1247–1263.
- Chow S., Kishino H. 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae, Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 41: 741-748.
- Clement M.D., Posada D., Crandall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659. *Molecular ecology*. 9. 1657-1659. 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x.

- CLIMAP Project Members. 1984. The last interglacial ocean. *Quaternary Research*, 21(2): 123-224. [https://doi.org/10.1016/0033-5894\(84\)90098-X](https://doi.org/10.1016/0033-5894(84)90098-X)
- Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Education Psychology Measurements* 20: 37–46.
- Corti M. 1993. Geometric Morphometrics: An extension of the revolution. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 302–303.
- Cross T.F. 2000. Genetic implications of translocation and stocking of fish speaces, with particular reference to Western Australia. *Aquaculture Research* 31: 83-94.
- Cruzan MB, Templeton AR. 2000. Paleoecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends in Ecological Evolution*, 15(12): 491-496.
- Dadzie S., Wangila B.C.C. 1980. Reproductive biology, length-weight relationship and relative condition of pond raised *Tilapia zilli* (Gervais). *Journal of Fish Biology* 243–253.
- Debes P.V., Zachos F.E., Hanel R. 2008. Mitochondrial phylogeography of the European sprat (*Sprattus sprattus* L., Clupeidae) reveals isolated climatically vulnerable populations in the Mediterranean Sea and range expansion in the Northeast Atlantic. *Molecular Ecology*, 17: 3873 –3888.
- Degens E.T., Deuser W.G., Haedrlch R.L. 1969. Molecular structure and composition offish otoliths. *Marine Biology* 2: 105-113.
- De la Herrán R., Rejón C.R., Rejón M.R., Garrido-Ramos M.A. 2001. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) base don two satellite DNA families. *Heredity*, 87: 691-697.
- DGPA, 2016. Datapescas N°110-Janeiro a Setembro 2016. DGPA (Eds.)
- Diouf P.S. 1996. Les peuplements de poissons des milieux estuariens de l' Afrique de l'ouest: l'exemple de l'estuaire hyperalin du Sine-Saloum. These, Université Montpellier II, França, 178p.
- Domingues V.S., Brito A., Alexandrou M., Almada V.C. 2007. Mitochondrial and nuclear markers reveal isolation by distance and effects of Pleistocene glaciations in the northeastern Atlantic and Mediterranean populations of the white seabream (*Diplodus sargus*, L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 346: 102-113.
- Domínguez-Seoane R, Pajuelo J.G., Lorenzo J.M., Ramos A.G. 2006. Age and growth of the sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) inhabiting the Canarian archipelago, estimated by reading otoliths and by backcalculation. *Fisheries Research* 81: 142-148.
- Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O.G. 2005. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22:1185-1192.
- Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214.

- Dryden I.L., Mardia K.V. 1998. Statistical shape analysis. John Wiley & Sons, New York. 347p.
- Dujakovic J.J., Glamuzina B. 1988. Preliminary studies of reproduction and early life history of *Diplodis vulgaris* (E. Geoffrey Saint Hilaire, 1987) in captivity. *Aquaculture* 69: 367-377.
- Emerson N.R. 2002. Archean to Anthropocene: Field Guides to the Geology of the Mid-continent of North America. James D. Miller, George H. Hudak, Chad Wittkop, Patrick I. McLaughlin (Eds).
- Excoffier L., Lischer H. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564– 567.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479– 491.
- FAO. 2004. State of World Fisheries and Aquaculture 2004. FAO, Rome, 153p.
- Farias I., Vieira A.R., Gordo L.S. e Figueiredo I. 2009. Otolith shape analysis as a tool for stock discrimination of the black scabbardfish, *Aphanopus carbo* (Lowe, 1839) (Pisces: Trichiuridae), in Portuguese waters. *Scientia Marina* 73: 47-53.
- Faurby S., Barber P.H. 2012. Theoretical limits to the correlation between pelagic larval duration and population genetic structure. *Molecular Biology* 21 (14): 3419-3432.
- Fiedler K. 1991. Familie Sparidae. *In* Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Teil 2: Fische (Starck, D. ed.): 354-355.
- Figueira W.F., Booth D.J. 2010. Increasing ocean temperatures allow tropical fishes to survive overwinter in temperate waters. *Global Change Biology* 16: 506–516.
- Fowler H.W. 1936. The marine fishes of West Africa, based on the collection of the American Museum Congo Expedition 1909-1915. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 70: 607-1493.
- Francisco S.M., Faria C., Lengkeek W., Vieira M.N., Velasco E.M., Almada V.C. 2011. Phylogeography of the shanny *Lipophrys pholis* (Pisces: Blenniidae) in the NE Atlantic records signs of major expansion event older than the last glaciation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 403 (1): 14-20.
- Francisco S.M., Robalo J.I., Stefanni S., Levy A., Almada V.C. 2014a. *Gaidropsarus* (Gadidae, Teleostei) of the North Atlantic Ocean: a brief phylogenetic review. *Journal of Fish Biology* 85 (2): 473-87. doi: 10.1111/jfb.12437.
- Francisco S.M., Almada V.C., Faria C., Velasco E.M., Robalo J.I. 2014b. Phylogeographic pattern and glacial refugia of a rocky shore species with limited dispersal capability: the case of Montagu's blenny (*Coryphoblennius galerita*, Blenniidae). *Marine Biology*: 1–12. doi: 10.1007/s00227-014-2523-6.

- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fraser D.J., Bernatchez L. 2001 Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10(12): 2741-2752.
- Froese R., Pauly D. (eds) 2018. FishBase (version Feb 2018). In: Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. 2018. Species 2000 & IT IS Catalogue of Life, 28th March 2018. Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.
- Fu Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:437-460.
- Galley E.A., Wrihgt P.J., Gibb F.M. 2006. Combined methods of otolith shape analysis improve identification of spawning areas in Atlantic cod. *ICES Journal of Marine Science* 63: 1710-1717.
- Galton F. 1907. Classification of Portraits. *Nature* 76: 617–618.
- Gauldie R.W. 1988. Tagging and genetically isolated stocks of fish: a test of one stock hypothesis and the development of another. *Journal of Applied Ichthyology* 4: 168-173.
- Girardin M. 1978. Les Sparidae du Golfe du Lion. *Ecologie et biogéographie*. DEA. USTL. Montpellier. 140 p.
- Good P. 1994. Permutation Tests: A Practical Guide to Resampling for Testing Hypotheses. Springer-Verlag, New York. 270p.
- Gonçalves J.M.S. 2000. Biologia pesqueira e dinamica populacional de *Diplodus vulgaris* (Geoffr.) e *Spondyliosoma cantharus* (L.) (Pisces, Sparidae) na costa sudoeste de Portugal. (sapientia.ualg.pt)
- Gonçalves J.M.S., Erzini K. 2000. The reproductive biology of the two-banded sea bream (*Diplodus vulgaris*) from the southwest coast of Portugal. *Journal of Applied Ichthyology* 16(3): 110–116.
- Gonçalves J.M.S., Bentes L., Coelho R., Correia C., Lino P.G., Monteiro C.C., Ribeiro J., Erzini K. 2003. Age and growth, maturity, mortality and yield-per-recruit for two banded bream (*Diplodus vulgaris* Geoffr.) from the south coast of Portugal. *Fisheries Research* 62: 349- 359.
- González-Wangüemert M, Pérez-Ruzafa Á, García Charton JA, Marcos C (2006b) Genetic differentiation and gene flow of two sparidae subspecies, *Diplodus sargus sargus* and *Diplodus sargus cadenati*, in Atlantic and SW Mediterranean populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 89(4):705–718
- Gordoa A., Molí B. 1997. Age and growth of the sparids *Diplodus vulgaris*, *D. sargus* and *D. annularis* in adult populations and the differences in their juvenile growth patterns in the north-western Mediterranean Sea. *Fisheries Research* 33: 123-129.
- Gower J.C. 1975. Generalized Procrustes analysis. *Psychometrika* 40: 33–51.

- Greer Walker M., Witthames P. R., Bautista de los Santos I. 1994. Is the fecundity of the Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*: Scombridae) determinate? *Sarsia* 79:13-26
- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Carroll S.B., Doebley J. 1974. Introdução à genética. Guanabara Koogan.
- Gurgel H.C.B. 2004. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21 (1): 131-135.
- Gysels E.S., Hellemans B., Pampoulie C., Volckaert F. 2004. Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Molecular ecology*. 13. 403-17. 10.1046/j.1365-294X.2003.02087.x.
- Hadj Taieb A., Ghorbel M., Ben Hadj Hamida N., Jarboui O. 2012. Reproductive biology of *Diplodus vulgaris* (Teleostei, Sparidae) in the southern Tunisian waters (Central Mediterranean). *Acta Adriatica*, 53(3): 437 – 446.
- Hanel R., Sturmbauer C. 2000. Multiple recurrent evolution of trophic types in northeastern Atlantic and Mediterranean seabreams (Sparidae, Percoidei). *Journal of Molecular Evolution* 50: 276-283.
- Harmelin-Vivien M.L., Harmelin J.G., Leboulleux V. 1995. Microhabitat requirements for settlement of juvenile sparid fishes on Mediterranean rocky shores. *Hydrobiologia* 300 (301): 309– 320.
- Hawkins S.J., Sugden H.E., Mieszkowska N., Moore P.J. 2009. Consequences of climate-driven biodiversity changes for ecosystem functioning of North European rocky shores. *Mar Ecol Prog Ser* 396: 245–259
- Hayes D.B., Ferreri C.P. e Taylor W. 1996. Linking fish habitat to their population Dynamics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 383-390.
- Hempel G. 1979. Early life history of marine fish: the egg stage. English, Book, Illustrated edition, Seattle. Washington Sea Grant: distributed by University of Washington Press. 70p.
- Henriques M., Gonçalves E.J., Almada V.C. 1999. The conservation of littoral fish communities: a case study at the Arrábida coast (Portugal). In: Almada V.C., Oliveira R., Gonçalves E.J. (eds). *Behaviour and conservation of littoral fishes*. ISPA, Lisbon, p 473–519.
- Henriques M., Gonçalves E.J., Almada V.C. 2007. Rapid shifts in a marine fish assemblage follow fluctuations in winter sea conditions. *Marine Ecology Progress Series* 340: 259-270.
- Hermant M., Lobry J., Bonhommeau S., Poulard J.C., Le Pape O. 2010. Impact of warming on abundance and occurrence of flatfish populations in the Bay of Biscay (France). *Journal Sea Research* 64: 45-53.

- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hewitt G.M. 2008. Speciation, hybrid zones and phylogeography — or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10(3): 537-549
- Hickerson M.J., Cunningham C.W. 2006. Nearshore fish (*Pholis gunnellus*) persists across the North Atlantic through multiple glacial episodes. *Molecular Ecology* 15:4095-4107.
- Hilborn R., Walters C.J. 1992. Quantitative Fisheries Stock Assessment: Choice, Dynamics and Uncertainty. Hilborn, R., Walters, C.J. (Eds.). Chapman & Hall, New York. 570p.
- Hile R. 1950. A monograph for the computation of the growth of fish from scale measurements. *Transactions of the American Fisheries Society* 78:156-162.
- Horta M., Costa M.J., Cabral H. 2004. Spatial and trophic niche overlap between *Diplodus bellottii* and *Diplodus vulgaris* in the Tagus estuary, Portugal. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 84 (4): 837-842.
- Horta e Costa B., Assis J., Franco G., Erzini K., Henriques M., Gonçalves E.J., Caselle J.E. 2014. Tropicalization of fish assemblages in temperate biogeographic transition zones. *Marine Ecology Progress Series* 504: 241–252.
- Hunter J.R., Macewicz B., Lo N.C.H., Kimbrell A. 1992. Fecundity, spawning, and maturity of female Dover sole *Microstomus pacificus*, with an evaluation of assumptions and precision. *Fisheries Bulletin* 90: 101–128.
- Hurlbut T., Clay D. 1998. Morphometric and meristic differences between shallow- and deep-water populations of white hake (*Urophycis tenuis*) in the Southern Gulf of St. Lawrence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 2274-2282.
- Hyle A.R., McBride R.S., Olney J.E. 2014. Determinate versus indeterminate fecundity in American Shad, an anadromous clupeid. *Transactions of the American Fisheries Society* 143: 618–633.
- Ihssen P.E., Brooke H.E., Casselman J.M., McGlade J.M., Payne N.R., Utter F.M. 1981. Stock identification: materials and methods. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 1838–1855.
- INE/DGRM, 2009. Estatísticas de Pesca -2009. INE/DGRM.
- INE/DGRM, 2017. Estatísticas de Pesca -2017. INE/DGRM.
- Iwata H., Ukai Y. 2002. SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity* 93: 384-385.
- Jakobsen T., Fogarty M.J., Megrey B.A., Moksness E. 2009. Fish Reproductive Biology- Implications for Assessment and Management. Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, PO198SQ, United Kingdom. 429p.

- Jennings S., Pinnegar J.K., Polunin N.V.C., Warr K.J. 2001. Impacts of trawling disturbance on the trophic structure of benthic invertebrate communities. *Marine Ecology Progress Series* 213: 127–142.
- Kendall D.G. 1981. The statistics of shape. In: Barnett V. (Ed). *Interpreting multivariate data*. Wiley, New York. 75–80.
- Kendall D.G. 1984. Shape-manifolds, Procrustean metrics and complex projective spaces. *Bulletin of the London Mathematical Society* 16: 81–121.
- Kendall D.G. 1985. Exact distributions for shapes of random triangles in convex sets. *Adv. Applied Probability*. 17: 308– 329.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16 (2): 111–120. doi: 10.1007/BF01731581 1980.
- King, M. (1995) *Fisheries biology, assessment and management*. Fishing News Books, Oxford, 341.
- Klingenberg C.P. 2008. MorphoJ software. Version 1.02c. Faculty of Life Sciences, University of Manchester, UK [available on internet at http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm].
- Kohn L.M. 2005. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 279-308.
- Kraljević, M. et al, 2007. Age and growth of sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) in the eastern Adriatic Sea. *Cahiers de Biologie* 48 (2): 145-154.
- Kuhl F.P., Giardina C.R. 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Vision Graphs* 18: 236-258.
- Kuhner M.K. 2006. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22:768-770.
- Kumpf H.E., Vaught R.N., Grimes C.B., Johnston A.G., Nakamura E. L. 1987. *Proceedings of the Stock Identification Workshop*. NOAA Technical Memorandum NMFS–SEFC–199. US Department of Commerce, Washington, D.C. 228p.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
- Lambeck K., Yokoyama Y., Tony Purcell T. 2002. Into and out of the Last Glacial Maximum: sea-level change during Oxygen Isotope Stages 3 and 2. *Quaternary Science Reviews* 21 (2002) 343–360.
- Larmuseau M.H.D., Raeymaekers J.A.M., Ruddick K.G., Van Houdt J.K.J., Volckaert F.A.M. 2009. To see in different seas: spatial variation in the rhodopsin gene of the sand goby (*Pomatoschistus minutus*). *Molecular Ecology* 18 (20): 4227-4239.
- Lecomte-Finiger R. 1999. L’otolithe: la “boite noire” des Téléostéens. *Année Biol.* 35:107-122.

- Legendre P. e Legendre L. 1998. Numerical ecology. 2nd English edition. Elsevier Science, Amsterdam. 852p.
- Leguá J., Plaza G., Pérez D., Arkhipkin, A. 2013. Otolith shape analysis as a tool for stock identification of the southern blue whiting, *Micromesistius australis*. Latin American Journal of Aquatic Research 41(3): 479-489.
- Leitão F., Erzini K., Santos M.N., Monteiro C.C. 2009. *Diplodus* spp. assemblages on artificial reefs: importance for near shore fisheries. Fisheries Management and Ecology 16(2): 88-99. Doi. org/10.1111/j.1365-2400.2008.00646.x
- Lemos R.T., Pires H.O. 2004. The upwelling regime off the West Portuguese Coast, 1941-2000. International Journal of Climatology, 24: 511-524.
- Lester N.P., Shuter B.J., Abrams P.A. 2004. Interpreting the von Bertalanffy model of somatic growth in fishes: the cost of reproduction. Proceedings of the Royal Society of London Series Biological Sciences 271: 1625-1631.
- Lestrel P.E. 1989. Method for analyzing complex two-dimensional forms: Elliptical Fourier functions. American Journal of Human Biology 1(2):149-164.
- Lestrel P.E. 1997. Fourier descriptors and their applications in biology. Cambridge: Cambridge University Press. 466p.
- Levitus S., Boyer T.P. 1994. Temperature, 4. World Ocean Atlas, 1994, NOAA Atlas NESDIS. U.S. Gov. Printing Office, Washington, DC: 117pp.
- Lima F.P., Ribeiro P.A., Queiroz N., Hawkins S.J., Santos A.M. 2007. Do distributional shifts of northern and southern species of algae match the warming pattern? Global Change Biology 13: 2592-2604.
- Longhurst A.R., Pauly D. 1987. Ecology of Tropical Oceans. Academic Press, San Diego, CA, 407pp.
- Loy A., Busilacchi S., Costa C., Ferlin L., Cataudella S. 2000. Comparing geometric morphometrics and outlines fitting methods to monitor fish shape variability of *Diplodus puntazzo* (Teleostea, Sparidae). Aquacultural Engineering 21 (4): 271-283.
- Loy A., Mariana L., Bertelletti M., Tunesi L. 1998. Visualizing Allometry: Geometric Morphometrics in the Study of Shape Changes in the Early Stages of the Two-Banded Sea Bream, *Diplodus vulgaris* (Perciformes, Sparidae). Journal of Morphology 237: 137-146.
- Maggs C.A., Castilho R., Foltz D., Henzler C., Jolly M.T., Kelly J., Olsen J., Perez K.E., Stam W., Väinölä R., Viard F., Wares J. 2008. Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. Ecology 89 (11 Suppl): S108-22.
- Mäkinen H.S., Merilä J. 2008. Mitochondrial DNA phylogeography of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in Europe-evidence for multiple glacial refugia. Mol Phylogenet Evol. 46(1):167-82. Epub 2007 Jun 21.

- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- Man-Wai R., Quignard J.-P. 1984. Les sars *Diplodus sargus* (Linnaeus 1758) du golfe du Lion: croissance et caractéristiques des débarquements aux criées de Sète et du Grau-du-Roi. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 46(3):173-194.
- Marcus L.F. 1990. Traditional morphometrics. In: Rohlf F.J., Bookstein F.L. (Eds.). *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop*. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, 77–122.
- Martins F. de M., Domingues M.V. 2011. Filogeografia. *Revista da Biologia Vol. Esp. Biogeografia*: 26-30.
- Melvin G.D., Dadswell, M.J. & McKenzie, J.A. 1992. Usefulness of meristic and morphometric characters in discriminating populations of American shad (*Alosa sapidissima*) (Osteichthyes: Clupeidae) inhabiting a marine environment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49: 266–280.
- Metzelaar J. 1919. *Over tropisch Atlantische Visschen*. A.H. Kruyt, Amsterdam. 317p.
- Meyer A. 1993. Phylogenetic relationships and evolutionary processes in east African cichlid fishes. *Trends in Ecology & Evolution* 8: 279-284.
- Miller B.S., Kendall Jr.A.W. 2009. Fish reproduction. In *Early Life History of Marine Fishes*. University of California Press. Berkeley. 364p. Chapter 1: 9-37.
- Milton D.A., Shaklee J.B. 1987. Biochemical genetics and population structure of blue grenadier, *Macruronus novaezelandiae* (Hector) (Pisces: Merlucciidae), from Australian waters. *Marine and Freshwater Research* 38: 727– 742.
- Monteiro L.R. 1999. Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology* 48: 192– 199.
- Morales-Nin B. 1989. Growth determination of tropical fish by means of otolith interpretation and length frequency analysis. *Aquatic Living Resources* 2:241-254.
- Morales-Nin B. 2000. Review of growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fisheries Research* 46: 53-67. Doi: 10.1016/S0165-7836(00)00133-8.
- Moritz C., Faith D.P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, 7: 419–429.
- Moritz S.E., Feltz D.L., Fahrbach K.R., Mack D.E. 2000. The relation of self-efficacy measures to sport performance: a meta-analytic review. *Res Q Exerc Sport*. 2000 Sep, 71(3): 280-94. DOI:10.1080/02701367.2000.10608908
- Mouine N., Francour P., Ktari M., Chakroun-Marzouk N. 2007. The reproductive biology of *Diplodus sargus sargus* in the Gulf of Tunis (Central Mediterranean). *Scientia Marina* 71(3): 461-469.
- Mouine N., Francour P., Ktari M.H. Chakroun-Marzouk N. 2011. Reproductive biology of four *Diplodus* species *Diplodus vulgaris*, *D. annularis*, *D. sargus sargus* and *D. puntazzo* (Sparidae) in the Gulf of Tunis (central Mediterranean).

- Murua H., Saborido-Rey F. 2003. Female Reproductive Strategies of Marine Fish Species of the North Atlantic. *Science* 33: 23-31.
- Murua H., Kraus G., Saborido-Rey F., Witthames P.R., Thorsoen A., Junquera J. 2003. Procedures to estimate fecundity of marine fish species in relation to their reproductive strategy. *Journal Northwest Atlantic Fishery Science*: 33-53.
- Muss A., Robertson D.R., Stepien C.A., Wirtz P., Bowen B.W. 2001. Phylogeography of Ophioblennius: the role of ocean currents and geography in reef fish evolution. *Evolution* 55: 561–572.
- Nelson J.S. 2006. *Fishes of the World*. 4th ed. Hoboken (New Jersey, USA): John Wiley & Sons. 601p.
- Nelson G.A. 2013. Fish methods: fishery science methods and models in R. Package ‘fishmethods’.
- Nicastro K.R., Zardi G.I., Teixeira S., Neiva J., Serrao E.A., Pearson G.A. 2013. Shift happens: trailing edge contraction associated with recent warming trends threatens a distinct genetic lineage in the marine macroalga *Fucus vesiculosus*. *BMC Biology* 11: 6.
- Nicholas D., Chaalali A., Drouineau H., Lobry J., Uriarte A., Borja A., Boët P. 2011. Impact of global warming on European tidal estuaries: some evidence of northward migration of estuarine fish species. *Regional Environmental Change* 11: 639-649.
- Nikolsky G. V. 1963. *The Ecology of Fishes*. Natural History, Fish, Academic Press, 351p.
- O'Brien SJ. 1994. Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annual Review of Genetics* 28:467-89.
- Ostellari L., Bargelloni L., Penzo E., Patarnello P., Patarnello T. 1996. Optimization of single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of the mitochondrial control region in *Pagellus bogaraveo* (Sparidae, Teleostei): rationalized tools in fish population biology. *Animal Genetics* 27: 423– 427.
- Paiva R.B., Neves A., Vieira A.R., Sequeira V., Vendrell C., Costa M.J., Peleteiro M., Gordo L. 2014. Cystic structures in fish ovaries: More common than we think. The case study of *Sarpa salpa* (Sparidae). *Cybium: international journal of ichthyology* 38(2): 158-160.
- Pajuelo J.G., Lorenzo J.M. 2001. Biology of the annular seabream, *Diplodus annularis* (Sparidae) in coastal waters of the Canary Islands. *Journal of Applied Ichthyology* 17: 121-125.
- Pajuelo J.G., Lorenzo J.M. 2002a. Growth and age estimation of *Diplodus sargus cadenati* (Sparidae) off the Canary Islands. *Fisheries Research* 59(1-2): 93-100.
- Pajuelo J.G., Lorenzo J.M. 2002b. Age and growth of the annular seabream, *Diplodus annularis* (Pisces; Sparidae), from the Canarian archipelago (central–east Atlantic). *Ciencias Marinas* 28: 1–11.

- Pajuelo J.G., Lorenzo J.M. 2003. The growth of the common two-banded seabream, *Diplodus vulgaris* (Teleostei, Sparidae), in Canarian waters, estimated by reading otoliths and by back-calculation. *Journal of Applied Ichthyology* 19: 79-83.
- Pajuelo J.G., Lorenzo J.M. 2004. Basic characteristics of the population dynamic and state of exploitation of Moroccan white seabream *Diplodus sargus cadenati* (Sparidae) in the Canarian archipelago. *Journal of Applied Ichthyology* 20:15-21.
- Pajuelo J.G., Lorenzo J.M., Bilbao A., Ayza O., Ramos A.G. 2006. Reproductive characteristics of the benthic coastal fish *Diplodus vulgaris* (Teleostei: Sparidae) in the Canarian archipelago, northwest Africa. *Journal of Applied Ichthyology* 22(5): 414–418.
- Pajuelo J.G., Lorenzo J.M., Dominguez-Seoane R. 2003a. Age estimation and growth of the zebra seabream *Diplodus cervinus cervinus* (Lowe, 1838) on the Canary Islands shelf (Central-east Atlantic). *Fisheries Research* 62: 97-103.
- Pajuelo J.G., Lorenzo J.M., Dominguez-Seoane R., Ramos A., Gregoire M. 2003b. On population ecology of the zebra seabream *Diplodus cervinus cervinus* (Lowe, 1838) from the coast of the Canarian archipelago, North West Africa. *Environmental Biology of Fish* 67: 407-416.
- Pajuelo J.G., Lorenzo J.M., Domínguez-Seoane R. 2008. Gonadal development and spawning cycle in the digynic hermaphrodite sharpnout seabream *Diplodus puntazzo* (Sparidae) off the Canary Islands, northwest of Africa. *Journal of Applied Ichthyology* 24: 68-76.
- Panfili J., Morales-Nin B. 2002. Semi-direct validation. In Panfili J., de Pontual H., Troadec H., Wright P.J. (Eds.) *Manual of fish sclerochronology*. Ifremer–IRD co-edition, Brest, France. 129–134.
- Panfili J., de Pontual H., Troadec H., Wright P.J. 2002 (Eds.). *Manual of fish sclerochronology*. Ifremer-IRD co-edition, Brest, France. 464p.
- Pastor C.M., Villegas Cuadros Ma.L. 1996. Age, growth and reproduction of *Diplodus sargus Linnaeus*, 1758 (Sparidae) north of Spain. *Boletín - Instituto Español de Oceanografía*. 12. 65-76.
- Payan P., De Pontual H., Bœuf G., Mayer-Gostan N. 2004. Endolymph chemistry and otolith growth in fish. *Comptes Rendus Palevol* 3 (6-7): 535-547.
- Pawson M.G., Jennings S. 1996. A critique of methods for stock identification in marine capture fisheries. *Fisheries Research* 25: 203-217.
- Pereira J.C., Lino P.G., Leitão A., Joaquim S., Chaves R., Pousão-Ferreira P., Guedes-Pinto H., dos Santos M.N. 2010. Genetic differences between wild and hatchery populations of *Diplodus sargus* and *D. vulgaris* inferred from RAPD markers: implications for production and restocking programs design. *Journal of Applied Genetics* 51 (1): 67-72.
- Perry A.L., Low P.J., Ellis J.R., Reynolds J.D. 2005. Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* 308: 1912–1915.

- Pilling G.M., Kirkwood G.P., Walter S.G. 2002. An improved method for estimating individual growth variability in fish, and the correlation between von Bertalanffy growth parameters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 59: 424-432.
- Planes S., Macpherson E., Biagi F., García-Rubies A., Harmelin J., Harmelin-Vivien M., J-Y Jouvenel J-Y, Tunesi L., Vigliola L., Galzin R. 1999. Spatio-temporal variability in growth of juvenile sparid fishes from the Mediterranean littoral zone. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 79: 137-143.
- Prista, N., Vasconcelos R.P., Costa M.J., Cabral H. 2003. The demersal fish assemblage of the coastal area adjacent to the Tagus. *Oceanologica Acta* 26:525-536. Doi 10.1016/S0399-1784(03)00047-1.
- Querol M.V.M., Querol E., Gomes N.N.A. 2002. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), Bacia do Rio Uruguai Médio, Sul do Brasil. *Ilheringia, Série Zoologia* 92: 79-84.
- Rambaut A., Drummond A.J. 2007. Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Reina-Hervás J.A. Serrano P. 1987. Structural and seasonal variations of inshore fish populations in Málaga Bay, Southeastern Spain. *Marine Biology* 95: 501-508.
- Relvas P., Barton E.D., Dubert J., Oliveira P.B., Peliz Á., da Silva J.C.B., Santos A.M.P. 2007. Physical oceanography of the western Iberia ecosystem: latest views and challenges. *Progress in Oceanography* 74: 149–173.
- Richard J., Kestenmont R. 2003. Liver changes related to oocyte growth in roach a sigle spawner fish, and in bleak and white bream, two multiple spawner fish. *International Review of Hydrobiology* 88: 68– 76.
- Riddle B., Hafner D. 2006. A step-wise approach to integrating phylogeographic and phylogenetic biogeographic perspectives on the history of a core North American warm deserts biota. *Journal of Arid Environments*, 66: 435-461. 10.1016/j.jaridenv.2006.01.014.
- Ripley, B. D., 1996. *Pattern Recognition and Neural Networks*. Cambridge University Press, Cambridge. 416p.
- Robalo J.I., Castilho R., Francisco S.M., Almada F., Knutsen H., Jorde P.E., Pereira A.M., Almada V.C. 2011. *Ecology and Evolution*, 2 (1): 153-164.
- Robalo J.I., Castilho R., Francisco S.M., Almada F., Knutsen Halvor, Jorde P.E., Pereira, A.M., Almada V.C. 2012. Northern refugia and recent expansion in the North Sea: the case of the wrasse *Symphodus melops* (Linnaeus, 1758). *Ecology and Evolution* 2,1:153-164. doi: [10.1002/ece3.77](https://doi.org/10.1002/ece3.77)
- Robalo J.I., Lima C.S., Francisco S.M., Almada F., Bañon R., Villegas-Ríos D., Almada V.C. 2013a. Monitoring Climate Change Impact on the Genetic Population Structure: The Case of the Fivebeard Rockling (*Ciliata Mustela*, Linnaeus, 1758) In Its Southern Limit

of Distribution. Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology 1 (4): 1 - 6.
doi: 10.4172/2329-9002.1000123

Robalo J.I., Crespo A.M., Castilho R. Francisco S.M., Amorim M.C.P., Almada V.C. 2013b. Are local extinctions and recolonizations continuing at the colder limits of marine fish distributions? *Halobatrachus didactylus* (Bloch & Schneider, 1801), a possible candidate. Marine Biology, online 1st: 1-7.
doi: 10.1007/s00227-013-2241-5

Robalo J.I., Lima C.S., Francisco S.M., Almada F., Bañón R., Villegas-Ríos D., Almada V.C. 2014. Phylogeography of the fivebeard rockling (*Ciliata mustela*, Linnaeus, 1758): a possible candidate fish to monitor climate change impact on genetic population structure. Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology. 2: 123. doi: 10.4172/2329-9002.1000123

Rodriguez R.B., Rodriguez A. 1984. Overlap of counted characters and its use in numeric taxonomy. Application to *Diplodus bellottii* and *Diplodus annularis* (Pisces, Sparidae) from the Gulf of Cadiz. Inv. Pesq. Barcelona 48 (2): 319-316.

Rogers A.R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. Evolution 49: 608-615.

Rogers A.R., Harpending H.C. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular Biology and Evolution 9: 552-569.

Rohlf F.J., Slice D.E. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. Systematic Zoology 39: 40– 59.

Rohlf F.J., Marcus L.F. 1993. A Revolution in Morphometrics. Trends in Ecology and Evolution 8: 129– 132.

Rohlf F.J. 1999a. On the use of shape spaces to compare morphometric methods. Hystrix 11: 1– 17.

Rohlf F.J. 1999b. Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. Journal of Classification 16: 197– 223.

Rohlf F.J. 2006. Tps Dig. Version 2.10. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, USA [available on internet at <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>]

Rucabado J., Lloris D. 1977. Sobre la presencia de *Diplodus senegalensis* Cadenet, 1964, en la área de afloramiento del NW de África (23°-26° lat. N). Rapport Experiences Cientifiques 6 :291-296.

Rucabado J., Lloris D., Allue C. 1978. *Diplodus senegalensis* Cadenat, 1964, prima cita para la ictiofauna europea. Resultados Expediciones Cientificas del Buque Oceanograficos Cornide de Saavedra. Investigation Pesquera 77: 163-167.

Sala, E., Ballesteros E. 1997. Partitioning of space and food resources by three fish of the genus *Diplodus* (Sparidae) in a Mediterranean rocky infralittoral ecosystem. Marine Ecology Progress Series 152: 273-283.

- Samamé, M., 1977. Determinacion de la edad y crecimiento de la sardina (*Sardinops sagax sagax*). Bol. Inst. Mar. Peru 3 (3):95-112.
- Sánchez R.F., Relvas P., Delgado M. 2007. Coupled ocean wind and sea surface temperature patterns off the western Iberian Peninsula. Journal of Marine Systems 68: 103–127.
- Santos M.N., Monteiro, C.C., Erzini K., Lasserre G. 1998. Maturation and gill-net selectivity of two small sea breams (genus *Diplodus*) from the Algarve coast (south Portugal). Fisheries Research 36: 185-194.
- Santos M.N., Monteiro C.C., Lasserre G. 2005. Observations and trends on the intra-annual variation of the fish assemblages on two artificial reefs in Algarve coastal waters (southern Portugal). Scientia Marina 69: 415 – 426.
- Santos M.N., Leitão F., Moura A., Cerqueira M., Monteiro C.C. 2011. *Diplodus* spp. on artificial reefs of different ages: influence of the associated macrobenthic community. ICES Journal of Marine Science 68(1): 87-97.
- Sarà M., Favalaro E., Mazzola A. 1999. Comparative morphometrics of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo* Cetti, 1777), reared in different conditions. Aquacultural Engineering 19(3):195-209.
- Schneider W. 1990. FAO species identification sheets for fishery purposes. Field guide to the commercial marine resources of the Gulf of Guinea. Prepared and published with the support of the FAO Regional Office for Africa. Rome: FAO. 268 p.
- Shaklee J.B., Currens K.P. 2003. Genetic stock identification and risk assessment. In: Hallerman EM, editor. Population genetics: principles and applications for fisheries scientist. Bethesda (MD): American Fisheries Society. 291–328.
- Simon R.C., Larkin P.A. (Eds) 1972. The Stock Concept in Pacific Salmon. H.R.MacMillan Lectures in Fisheries. Univ. British Columbia. 565p.
- Smith T.B., Wayne R.K. 1996. Approaches in Conservation. Oxford University Press. Oxford UK.
- Sneath P.H.A. 1967. Trend-surface analysis of transformation grids. Journal Zoology London 151: 65-122.
- Sotka E.E., Wares J.P., Barth J.A., Grosberg R.K., Palumbi S.R. 2004. Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. Molecular Ecology, 13: 2143–2156. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02225.x
- Stebbing A.R.D., Turk S.M.T., Wheeler A., Clark K.R. 2002. Immigration of southern fish species to south-west England linked to warming of the North Atlantic (1960-2001). Journal Marine Biology Association UK 82: 177-180.
- Steindachner F. 1882. Beitrage zur Kenntnis der Meeresfische Afrika's und Beschreibung einer neuen Sargus-Art von den Galapagos-Inseln. Denkschriften/Akademie der Wissenschaften in Wien 44:19-58.

- Stiassny M.L.J. 1996. An overview of freshwater biodiversity: with some lessons from African fishes. *Fisheries* 21: 7-13.
- Stransky C., e MacLellan S.E. 2005. Species separation and zoogeography of redfish abd rockfish (genus *Sebastes*) by otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 62: 2265-2276.
- Stransky C., Murta A.G., Schlickeisen J., Zimmermann C. 2008a. Otolith shape analysis as a tool for stock separation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the northeast Atlantic and Mediterranean. *Fisheries Research* 89: 159-166.
- Stransky C., Baumann H., Fevolden S.E., Harbitz A., Høie H., Nedreaas K.H., Salberg A.B., Skarstein T.H. 2008b. Separation of Norwegian coastal cod and northeast Arctic cod by outer otolith shape analysis. *Fisheries Research* 90: 26-35.
- Stratoudakis Y., Bernal M., Ganias K., Uriarte A. 2006. The Daily Egg Production Method (DEPM): recent advances, current applications and future challenges. *Fish and Fisheries* 7: 35–57.
- Strauss R.E., Bookstein F.L. 1982. The truss: body form reconstruction in morphometrics. *Systematic Zoology* 31:113-135.
- Sumaila U.R., Cheung W.W.L., Lam V.W.Y., Pauly D., Herrick S. 2011. Climate change impacts on the biophysics and economics of world fisheries. *Climate Change* 1: 449–456.
- Summerer M. Hanel R., Sturmbauer C. 2001. Mitochondrial phylogeny and biogeographic affinities of seabreams of the genus *Diplodus* (Sparidae). *Journal of Fish Biology* 59, 1638-1652.
- Swain D.P. e Foote C.J. 1999. Stocks and chameleons: the use of phenotypic variation in stock identification. *Fisheries Research* 43: 113-128.
- Swain D.P., Hutchings J.A., Foote C.J. 2005. Environmental and genetic influences of stock identification characters. In: Cadrin S.X., Friedland K.D. and Waldman, J. R. (Eds.), *Stock identification methods - applications in fishery science*. Elsevier Academic Press. 153-172.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cosson J.F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7(4): 453-64.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-46.
- Taylor E.B., McPhail J.D. 1985. Variation in burst and prolonged swimming performance among British Columbia populations of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42: 2029–2033.
- Templeman W. 1982. Stock Discrimination in Marine Fishes. NAFO SCR Doc. 82/IX/79.
- Templeton A.R., 2005. Haplotype Trees and Modern Human Origins. *Yearbook Physical Anthropology*, 128(41): 33-59.

- Templeton A.R., Crandall K.A., Sing C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619-633.
- Titus K., Mosher J.A., Williams B.K. 1984. Chance-corrected classification for use in discriminant analysis: ecological applications. *The American Midland Naturalist* 111: 1–7.
- Thorpe R.S. 1983. A review of the numerical methods for recognized and analysing racial differentiation. In *Numerical Taxonomy* (Felsenstein, J., Ed.). NATO ASI Series G1. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 404-423.
- Torrioni A., Achilli A., Macaulay V., Richards M., Bandelt H. 2006. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree. *Trends in Genetics*, 22 (6): 339-345.
- Tortonese E. 1975. Fauna de Italia 'Osteichthyes'. 'Pesci Ossei.', Vol. XI: 82-122. Calderini, Bologna.
- Tracey S.R., Lyle J.M. e Duhamel G. 2006. Application of elliptical Fourier analysis of otolith form as a tool for stock identification. *Fisheries Research* 77: 138-147.
- Turan C. 2004. Stock identification of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) using morphometric and meristic characters. *ICES Journal of Marine Science* 61: 774-781.
- Tuset V.M., Lozano I.J., González J.A., Pertusa J.F., García-Díaz M.M. 2003. Shape indices to identify regional differences in J.A. otolith morphology of scomber, *Serranus cabrilla* (L., 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 19: 88-93.
- Tyler C., Sumpter J. 1996. Oocyte growth and development in teleost. *Rev. Fish Biol. Fisheries*. 6. 287-318. 10.1007/BF00122584.
- van der Walt B.A., Beckley L.E. 1997. Age and growth of *Sarpa salpa* (Pisces: Sparidae) off the east coast of South Africa. *Fishery Research* 31: 241-248.
- Vazzoler A.E.A.M. 1982. Manual de Métodos para Estudos Biológicos de Populações de Peixes: Reprodução e Crescimento. Programa Nacional de Zoologia, Brasília, CNPq. 106p.
- Vicentini R.N., Araújo F.G. 2003. Sex ratio and size structure of *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) (Perciformes, Sciaenidae) in Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 63(4):559-566.
- Vigliola L., Harmelin-Vivien, M.L., Biagi F., Galzin R., GarcíaRubies A., Harmelin J.G., Jouvenel, J.Y., Le Dieach-Boursier L., Macpherson E., Tunesi, L. 1998. Spatial and temporal patterns of settlement among *Diplodus* sparid fishes in the northwestern Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* 168: 45–56.
- Vinagre C., Santos F.D., Cabral H.N., Costa M.J. 2009. Impacto f climate and hydrology on juvenile fish recruitment towards estuarine nersery grounds in the contexto of climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85: 479-486.

- Vinagre C., Cabral H.N., Costa M.J. 2010. Relative importance of estuarine nurseries for species of the genus *Diplodus* (Sparidae) along Portuguese coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 86: 197-202.
- Vinagre C., Narciso L., Cabral H.N., Costa M.J., Rose R. 2014. Thermal sensitivity of native and invasive seabreams. *Marine Ecology*, 35: 292-297.
- Waldman J.R. 1999. The importance of comparative studies in stock analysis. *Fisheries Research* 43: 237-246.
- Waldman J.R. 2007. Definition of Stocks: An Evolving Concept. In S.X. Cadrin, K.D. Friedland & J.R. Waldman (Eds.). *Stock identification methods*. Elsevier, Amsterdam, 719 p. Chapter 2:7-16.
- Wallace R. e Selman K. 1981. Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts. *Integrative and Comparative Biology - INTEGR COMP BIOL*. 21. 325-343. 10.1093/icb/21.2.325.
- Ward R.D. 2006. The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programs. *Fisheries Research* 80: 9-18.
- Wares J.P., Cunningham C.W. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 55(12):2455-2469.
- Weatherley A.H., Gill H.S. 1987. *The Biology of Fish Growth*. Academic Press, New York.
- Weersing K., Toonen R.J. 2009. Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 393: 1–12.
- Wernberg T., Thomsen M.S., Connell S.D., Russell B.D., Waters J.M. 2013. The Footprint of Continental-Scale Ocean Currents on the Biogeography of Seaweeds. *PLOS ONE* 8(11): e80168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080168>
- West, G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 41 (2): 199-222.
- Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E. (1986) *Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean*. Unesco: Paris. Volume I–III: 1–1473.
- Wilks S.S. 1932. Certain generalizations in the analysis of variance. *Biometrika* 24: 471–494.
- Wright J.P., Jones C.G., Flecker A.S. 2002. An ecosystem engineer, the beaver, increases species richness at the landscape scale. *Oecologia* 132:96–101. Doi: 10.1007/s00442-002-0929-1
- Zar J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Eryelwood Cliffs, N.J. 663p.

APÊNDICES

APÊNDICES I e II

Apêndice I. Estádios macroscópicos e microscópicos de maturação para fêmeas (baseado em Brown-Petersen et al, 2011). (CA= alvéolo cortical; GVBD=rotura da vesícula germinal; GVM=migração da vesícula germinal; OM=maturação do oócito; PG= crescimento primário; POF=folículo pós-ovulatório; Vtg1=oócito vitelogénico primário; Vtg2=oócito vitelogénico secundário; Vtg3=oócito vitelogénico terciário).

Estádio	Designação	Descrição macroscópica e microscópica dos ovários
I	Imaturo	Ovários pequenos, normalmente transparentes, sem vasos sanguíneos visíveis. Só oócitos PG presentes. Sem atresias ou fibras musculares. Parede ovárica fina e estreito espaço entre os oócitos.
II	Desenvolvimento	Ovários mais desenvolvidos, com vasos sanguíneos a tornarem-se mais distintos. Oócitos PG, CA, Vtg1 e Vtg2 presentes. POFs ou oócitos Vtg3 não evidentes. Atrésia pode estar presente.
III	Desova	Ovários grandes, vasos sanguíneos proeminentes. Oócitos visíveis a olho. Oócitos Vtg3 presentes ou POFs presentes nos reprodutores parciais. Atrésia de oócitos vitelogénicos e hidratados pode estar presente. Primeiros estádios de OM podem estar presentes. Oócitos avançam para GVM GVBD, hidratação e ovulação.
IV	Regressão	Ovários flácidos, com vasos sanguíneos proeminentes. Atrésia e POFs presentes. Alguns CA e oócitos vitelogénicos (Vtg1 e Vtg2) presentes.
V	Regeneração	Ovários pequenos, vasos sanguíneos reduzidos mas presentes. Apenas presença de oogónias e oócitos PG. Fibras musculares, vasos sanguíneos, parede ovárica espessa e gama ou delta atrésia ou POFs velhos e em degeneração podem estar presentes.

Apêndice II. Estádios macroscópicos e microscópicos de maturação para machos (baseado em Brown-Petersen et al, 2011). (GE= epitélio germinal; Sc1=espermátócito primário; Sc2= espermátócito secundário; Sg1= espermátogônia primária; Sg2= espermátogônia secundária; St= espermátídeo; Sz= espermatozóide).

Estádio	Designação	Descrição macroscópica e microscópica dos testículos
I	Imaturo	Testículos pequenos, normalmente transparentes, em forma de fio. Apenas Sg1 presentes. Não existência de lúmen nos lóbulos.
II	Desenvolvimento	Testículos pequenos mas facilmente identificáveis. Espermátócitos evidentes ao longo dos lóbulos. Sg2, Sc1, Sc2, St e Sz podem estar presentes nos espermátócitos. Sz não presentes no lúmen dos lóbulos nem nos espermiductos Epitélio germinal contínuo ou descontínuo.
III	Desova	Testículos grandes, vasos sanguíneos proeminentes. Oócitos visíveis a olho. Pode libertar esperma quando se pressiona ligeiramente o abdómen. Sz presente no lúmen dos lóbulos e nos espermiductos. Todos os estádios celulares da espermatogénese: Sg2, Sc, St, Sz podem estar presentes. Espermátócitos em todo o testículo, espermatogénese ativa. Epitélio germinal descontínuo.
IV	Regressão	Testículos flácidos, com vasos sanguíneos proeminentes. Sz residuais no lúmen dos lóbulos e nos espermiductos. Espermátócitos muito espaçados perto da periferia contendo Sc2, St, Sz. Pouca ou nenhuma espermatogénese ativa. Proliferação de espermátogónias e regeneração do epitélio germinal na periferia dos testículos.
V	Regeneração	Testículos pequenos, vasos sanguíneos reduzidos mas presentes. Sem espermátócitos, lúmen dos lóbulos inexistente. Proliferação de espermátogónias nos testículos. Epitélio germinal contínuo. Alguns Sz residuais ou ocasionalmente presentes no lúmen dos lóbulos e espermiductos.